

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Análisis de la interacción entre el virus de la gripe y la respuesta celular innata

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por María Teresa Pérez Cidoncha
para optar al título de Doctor

Madrid, Junio de 2013

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección del **Dr. Juan Ortín Montón**

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INDICE

ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	13
ABREVIATURAS	19
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	27
1. El virus de la gripe	27
1.1. Historia	27
1.2. Clasificación y nomenclatura	27
1.3. La partícula viral	28
1.4. Los RNAs virales	29
1.4.1. RNA genómico o viral (vRNA)	29
1.4.2. RNA complementario (cRNA)	31
1.4.3. RNA mensajero (mRNA)	31
1.4.4. RNA defectivo interferente (DIs)	31
2. El ciclo de infección viral	31
2.1. Adsorción y entrada de la partícula viral en la célula	31
2.2. Transcripción y replicación viral	31
2.3. Procesamiento de mRNAs virales y síntesis de proteínas	32
2.4. Formación de nuevas partículas virales	33
3. Cuasiespecies	34
4. Respuesta inmune innata celular	35
4.1. Reconocimiento celular de la presencia de patógenos (PAMPs)	35
4.2. Inducción de la expresión de interferón	37
4.3. Reconocimiento celular de interferón	37
4.4. Respuesta antiviral mediada por interferón	37
5. Mecanismos de bloqueo de la respuesta inmune innata por virus	39
5.1. Estrategias de bloqueo de la respuesta interferón mediadas por virus	39
5.2. La proteína NS1	41
5.2.1. Estructura y dominios de la proteína NS1	41
5.2.2. NS1 como modulador de la infección	41
5.2.3. NS1 como antagonista del sistema interferón	44
5.3. Otras proteínas virales	46
6. Saltos de huésped, adaptación y virulencia	46

OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
Materiales biológicos	55
1. Líneas celulares	55
2. Estirpes bacterianas	55
3. Virus	55
4. Plásmidos	55
5. Anticuerpos	56
6. Oligonucleótidos.....	57
Métodos	57
1. Manipulación de DNA y clonajes	57
1.1. Construcción por mutagénesis al azar de una genoteca de plásmidos mutantes del segmento NS	57
1.2. Construcción de los plásmidos con mutaciones puntuales en el plásmido pHH para el rescate de virus	57
2. Cultivos celulares	57
2.1. Mantenimiento celular	57
2.2. Infecciones	57
2.3. Transfecciones	58
2.3.1. Fosfato cálcico	58
2.3.2. Liposomas catiónicos	58
2.4. Centros infectivos	58
3. Técnicas virológicas	58
3.1. Generación de lotes virales	58
3.2. Pases seriados	58
3.3. Titulación de virus mediante ensayo de placa	58
3.4. Aislamiento de virus a partir de placa	58
3.5. Curvas de crecimiento.....	59
3.6. Purificación de viriones	59
3.7. Purificación de RNPs de viriones	59
3.8. Rescate de mutantes puntuales	59
3.9. Selección de virus mutantes mediante <i>cell-sorter</i>	59
4. Manipulación de RNPs	60
4.1. Reconstitución de RNPs recombinantes	60
4.2. Purificación RNPs recombinantes	60
4.2.1. Obtención de extractos celulares	60
4.2.2. Purificación por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ -NTA-Agarosa	60
4.3. Transcripción <i>in vitro</i> de RNPs	60
4.4. Transfección de RNPs	61

5. Análisis de RNA	61
5.1. Purificación de RNA	61
5.1.1. Purificación de RNA a partir de viriones	61
5.1.2. Purificación de RNA a partir de RNPs	61
5.2. Análisis de RNA	61
5.2.1. Electroforesis desnaturizante y tinción de plata	61
5.2.2. RT-PCR	61
5.2.3. Ultrasecuencia	63
6. Análisis de proteínas	63
6.1. Inmunofluorescencia	63
6.2. <i>Western Blot</i>	63
6.3. Medición de GFP	64
6.4. Medición de luciferasa	64
6.5. Medición de IFN mediante bioensayo	64
7. Análisis de secuencias	64
7.1. Alineamiento de secuencias	64
7.2. Búsqueda de deleciones	65

RESULTADOS 69

1. Generación y caracterización de mutantes afectados en el bloqueo de la respuesta interferón mediante mutagénesis al azar: Implicación de la proteína NS1 en el bloqueo de la respuesta IFN	69
1.1. Generación de mutantes puntuales al azar en el segmento NSVic	69
1.2. Rescate de virus por transfección de RNPs	69
1.3. Rescate de RNPs mutantes mediante transfección competitiva	70
1.4. Generación de virus mutantes puntuales al azar del segmento NSVic	71
1.5. Selección de virus afectados en el bloqueo de la respuesta IFN a partir de genotecas de virus mutantes	73
1.6. Análisis genotípico de los virus mutantes seleccionados	73
1.7. Análisis fenotípico de los virus mutantes seleccionados	74
1.8. Análisis de la interacción de los virus mutantes con el sistema inmune innato celular	79
1.9. Rescate de mutaciones puntuales del segmento NS en virus infectivo por el sistema de transfección de plásmidos	80
2. Generación y caracterización de mutantes afectados en el bloqueo de la respuesta interferón mediante pases seriados	82
2.1. Generación de poblaciones mutantes mediante pases seriados	82
2.2. Caracterización de las poblaciones virales	83
2.3. Selección de poblaciones virales mutantes mediante <i>cell sorter</i>	84
2.4. Análisis genotípico de las poblaciones seleccionadas	85
2.5. Análisis fenotípico de los mutantes individuales seleccionados	85
2.5.1. Análisis de la capacidad de replicación de los virus mutantes seleccionados	87
2.5.2. Análisis de la interacción de los virus seleccionados con el sistema inmune innato celular	90
2.6. Análisis genotípico de los mutantes seleccionados	93
2.7. Detección de deleciones en el genoma de los mutantes seleccionados	96
2.8. Rescate de mutaciones puntuales en virus infectivo por el sistema de transfección de plásmidos	97

DISCUSIÓN	103
1. Mutagénesis al azar: un estrategia segura	103
2. Relajar la presión selectiva: Una estrategia contraintuitiva	103
3. Mecanismos de bloqueo de la respuesta IFN por parte del virus de la gripe	104
3.1. Papel de NS1 en el bloqueo de la respuesta IFN	105
3.2. ¿Qué papel tiene el resto del genoma en el control de la respuesta IFN?.....	107
3.3. ¿Es realmente NS1 el principal antagonista de la respuesta IFN en el virus?	109
4. El papel de las partículas defectivas en la interacción del virus de la gripe con la respuesta celular innata	109
5. ¿Qué molécula actúa como PAMP en el virus de la gripe?	110
6. La compleja interacción entre el virus de la gripe y la respuesta inmune innata celular	111
7. Implicaciones de la respuesta innata en saltos de huésped y adaptación	112
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	141
1. Tabla de oligonucleótidos	141
2. Esquemas de deleciones encontradas en mutantes	145
3. Publicaciones	159

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla In1. Pandemias de gripe más conocidas	27
Fig. In1. El virus de la gripe	28
Fig. In2. Estructura del genoma del virus de la gripe	29
Fig. In3.	30
A) Diagrama de la síntesis de RNA viral	
B) Diagrama esquemático comparativo de un RNA DI y un vRNA	
C) Modelo tridimensional de la estructura de la RNP	
Fig. In4. Ciclo de infección viral	32
Fig. In5.	34
A) Esquema de la generación de mutaciones en la replicación de virus RNA	
B) Esquema de la estructura en cuasiespecies de los virus RNA	
Fig. In6. Respuesta del sistema celular innato a la infección por gripe	36
Fig. In7. Actividad antiviral de las enzimas y factores inducidos por IFN	38
Fig. In8. Mecanismos de bloqueo de la respuesta IFN por parte del virus de la gripe	40
Fig. In9.	42
A) Esquema de la proteína NS1 y sus dominios de interacción	
B y C) Estructura tubular de la proteína NS1	

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M1. Relación de agentes de selección utilizados en el mantenimiento de las líneas celulares	57
Fig. M1. Ultrasecuenciación por el método de Solexa Illumina	62
Tabla M2. Relación de anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia	63
Tabla M3. Relación de anticuerpos utilizados en ensayos de <i>Western Blot</i>	64

RESULTADOS

Fig. R1. Representación esquemática de la estrategia de mutagénesis seguida para obtener una genoteca de mutantes puntuales en el segmento NS	70
Fig. R2. Eficacia de incorporación de la RNP NS WSN en el entorno genético de la cepa Vic	71
Fig. R3. Representación esquemática del proceso seguido para la obtención de virus mutantes puntuales al azar en el segmento NS	72
Fig. R4. Representación esquemática de las proteínas NS1 y NEP y localización de las mutaciones obtenidas en los diferentes clones seleccionados	73
Tabla R1. Resumen de las mutaciones encontradas en los clones seleccionados.....	74
Fig. R5. Inducción de GFP bajo el promotor de IFN del virus Vic, delNS1, o de los virus mutantes	74
Fig. R6. Cinética de crecimiento del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes en células MDCK o MDCK-V2	75
Fig. R7. Rendimiento relativo máximo del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes en células MDCK o MDCK-V2 ..	76
Fig. R8. Cinética de acumulación de proteínas virales del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes.....	76
Fig. R9. Cinética de localización de las RNPs durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes ...	77
Fig. R10. Cinética de localización de NS1 durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes	78
Fig. R11. Secreción de factores antivirales durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes	79
Fig. R12. Inducción de Luciferasa bajo el promotor ISRE por infección con el virus Vic o los virus mutantes.....	80
Fig. R13. Análisis de la respuesta celular durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los virus mutantes	81

Fig. R14. Representación esquemática de los pases realizados a partir del virus silvestre	82
Fig. R15. Rendimiento relativo máximo de las poblaciones generadas en células MDCK o MDCK-V2	83
Fig. R16. Rendimiento relativo máximo de las poblaciones generadas en células MDCK o MDCK-V5.....	84
Fig. R17. Representación esquemática de las estrategias usadas con las células positivas provenientes del <i>cell-sorter</i>	84
Tabla R2. Resumen de las mutaciones encontradas en las poblaciones	86
Tabla R3. Resumen de los cambios de aminoácido encontrados en las poblaciones	87
Fig. R18. Inducción de GFP bajo el promotor de IFN del virus Vic, delNS1, o de los clones mutantes seleccionados	87
Fig. R19. Cinética de crecimiento del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes en células MDCK o MDCK-V2	88
Fig. R20. Rendimiento relativo máximo del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes en células MDCK o MDCK-V2	89
Fig. R21. Estudio comparativo de tamaño de placa de lisis en células MDCK <i>versus</i> MDCK-V2	89
Fig. R22. Cinética de acumulación de proteínas virales del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes seleccionados	90
Fig. R23. Cinética de localización de las RNPs durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes seleccionados	91
Fig. R24. Cinética de localización de NS1 durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes seleccionados	92
Fig. R25. Secreción de factores antivirales durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes seleccionados	93
Fig. R26. Inducción de Luciferasa bajo el promotor ISRE del virus Vic y de los clones mutantes seleccionados	94
Fig. R27. Análisis de la respuesta celular durante la infección del virus Vic, delNS1 o de los clones mutantes seleccionados	94
Tabla R4. Resumen de las mutaciones encontradas en los clones aislados	95
Fig. R28. Representación esquemática del tamaño y abundancia de las deleciones encontradas en el RNA genómico viral	97
Fig. R29. Verificación experimental de la presencia de RNAs delecionados	97
Tabla R5. Resumen de las deleciones presentes en los mutantes (N>2)	98
Tabla R6. Resumen de las deleciones más abundantes (N>20)	98

DISCUSIÓN

Fig. D1. Resumen de las mutaciones que afectan a NS	105
Fig. D2. Estructura de la proteína NS1 con las mutaciones estudiadas	106
Fig. D3. Resumen de las mutaciones que aparecidas durante los pases seriados	108
Fig. D4. Esquema de los mecanismos generales que ha adoptado el virus de la gripe para evadir la respuesta IFN	111

ABREVIATURAS

A: Adenosina	MM: masa molar
aa: aminoácido	mRNA: RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>)
a.C.: Antes de Cristo	Mx: <i>myxovirus (influenza virus) resistance 1</i>
ATCC: <i>American Type Culture Collection</i>	NA: Neuraminidasa
BSA: Seroalbúmina bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)	NEP: Proteína de exportación nuclear del virus de la gripe (NS2)
BVDV: Virus de la Diarrea Viral Bovina	NES: Señal de exportación nuclear (<i>Nuclear export signal</i>)
C: Citosina	NLS: Señal de localización nuclear (<i>Nuclear localisation signal</i>)
cDNA: DNA complementario	NP: nucleoproteína
CMV: promotor de Citomegalovirus	NS1: Proteína no estructural del virus de la gripe
CPSF: Factor de especificidad del corte y la poliadenilación	nt: Nucleótido
CPSF30: Subunidad de 30Kda del Factor de especificidad del corte y la poliadenilación	N-terminal: Extremo amino terminal
cRNA: RNA viral de polaridad positiva.	OA: Oligo Adenilato
cRNP: RNP que encapsida una molécula de cRNA	OAS: Oligo(A) Sintetasa
C-terminal: Extremo carboxilo terminal	ORF: <i>Open Reading Frame</i> o Fase de lectura abierta
Cys: Cisteína	PA: Proteína ácida del virus de la gripe
DE: Dominio Efector	pb: pares de bases
DEPC: Dietil pirocarbonato	PABPI: Proteína de unión a colas de poliA I (<i>Poly-(A) binding protein I</i>)
Desv.Std: Desviación Estándar	PABPII: Proteína de unión a colas de poliA II (<i>Poly-(A) binding protein II</i>)
DIs: Virus interferentes defectivos	PAMP: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PB1: Proteína básica 1 del virus de la gripe
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PB2: Proteína básica 2 del virus de la gripe
DNAsa: Desoxirribonucleasa	PBS: tampón fosfato salino
dsRNA: RNA de doble cadena (<i>double stranded RNA</i>)	PBSc: PBS completo
DTT: DL-Ditiotreitol	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
ECMV: Virus de la Miocarditis Encefálica	PKR: <i>Protein Kinase R</i> o Proteína quinasa R
eIF4G: Factor de iniciación eucariota 4G	PM: Peso Molecular
FBS: suero fetal bobino (<i>fetal bobine serum</i>)	pre-mRNA: Precursor de RNA mensajero
G: Guanosina	RBD: Dominio de unión a RNA
GFP: Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)	RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente (<i>RNA dependent RNA polymerase</i>)
Glu: glutámico	RNA: Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
h: Hora	RNAsa: Ribonucleasa
HA: Hemaglutinina	RNP: ribonucleoproteína
His: Histidinas	rRNA: RNA ribosomal
hpi: Horas post-infección	rpm: revoluciones por minuto
HPRI: Inhibidor de RNAsa de placenta humana	RT-PCR: Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.
hpt: Horas post-transfección	SDS: dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecylsulphate</i>)
IF: Inmunofluorescencia	splicing: Procesamiento de RNAs mensajeros
IFN: Interferón	ssRNA: RNA de cadena sencilla
ISG: <i>Interferon Stimulated Gene</i>	SV40: Virus 40 de simio
ISRE: <i>IFN-Stimulated Response Elements</i>	T: timidina
KDa: Kilodalton	TA: temperatura ambiente
log: logaritmo en base 10	U6 snRNA: RNA nuclear pequeño U6 (<i>small nuclear RNA U6</i>)
Luc: Luciferasa	U: Uridina
Lys: lisina	ufp: Unidades formadoras de placa
M: Molar	UTR: Región no traducida (<i>Untranslated region</i>)
M1: Proteína de matriz 1	Vic: cepa Victoria del virus de la gripe
M2: Proteína de matriz 2	vRNA: RNA viral genómico de polaridad negativa
MDCK: Células de riñón de perro Madin Darby (<i>Madin Darby canine kidney cell</i>)	vRNP: RNP que encapsida una molécula de vRNA
MDCK-V2: Células MDCK que expresan la proteína V del virus PIV2	WB: Western blot
MDCK-V5: Células MDCK que expresan la proteína V del virus PIV5	WSN: Cepa A/WSN/33
mdi: Multiplicidad de infección	wt: Tipo silvestre
Met: Metionina	
min: Minuto	

SUMMARY

SUMMARY

As a consequence of influenza virus infection, the cell fires an innate immune response to restrict the multiplication of the virus. In general, viruses have evolved a variety of countermeasures to avoid this response and maintain reasonable replication efficiency. The influenza A viruses counteract the cell innate immune response at several steps, including blocking the RIG I-dependent activation of interferon (IFN) transcription, the IFN-dependent activation of IFN-stimulated genes (ISGs) and the activity of various ISGs. The multifunctional NS1 protein provides most of the influenza virus modulation of the IFN response. In addition to NS1, in the last years other influenza virus genes have been reported to alter the cellular innate immune response.

To understand the role of NS1 in this counteraction, we introduced random mutations in NS segment. Using this strategy, we have obtained a population of 30.000-40.000 different mutant viruses and selected those able to induce IFN expression and to grow efficiently. The sequence analysis of the selected virus clones showed that non-synonymous mutations occurred at many phylogenetically conserved positions within NS1 protein, suggesting that they could be relevant for the mutant phenotype. Most of these mutant viruses showed normal replication kinetics and high titres and all mutants induced an IFN response stronger than wt virus. Surprisingly, one of the mutants led to an antiviral activity very similar to the one obtained with a mutant virus lacking NS1, although it contains a single aminoacid substitution.

To determine whether other viral genes are also important in the interplay between the virus and the host IFN response we have undertaken a non-biassed genetic approach. We carried out serial passage of wt virus in IFN non-responsive cells and selected for viruses that were able to induce IFN. We reasoned that, by replication in the absence of the IFN selection pressure the virus could mutate at positions normally restricted and could find new optimal sequence solutions. Deep sequencing of selected virus populations and individual virus mutants indicated that non-synonymous mutations occurred at many phylogenetically conserved positions in all virus segments. Several of these mutations are recurrent in independently evolved virus populations and also in individual mutants. Only one of the six individual virus mutants studied contained a mutation in NS1, although all of them induced IFN and ISGs and were unable to counteract added IFN. Several virus mutants accumulated large amounts of large internal deletions in several virus genes but nonetheless replicated to high titres and showed mutations in the M1/M2 proteins. These results suggest that essentially the complete virus gene complement is adapted to counteract the IFN response and drift away of such an optimal sequence when the IFN response is ablated.

In summary both approaches are complementary and allowed us to obtain a general map of the mechanisms exploited by the virus to counteract the IFN response. The results support the use of these strategies for the generation and identification of viral mutants affected in IFN counteraction.

INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS DE LA GRIPE

1.1. Historia

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa, que ha afectado al ser humano desde tiempos inmemoriales. Existen documentos históricos en los que se hace referencia a la aparición repentina de enfermedades respiratorias que perduran unos días o semanas y que desaparecen de igual forma. El primer documento histórico que podría hacer referencia a una epidemia de virus de la gripe fue escrito por Hipócrates en el año 412 a.C. A partir de entonces se conoce la aparición de numerosos episodios de gripe de distinta virulencia y repercusión desde la Edad media hasta la actualidad.

El agente causal de la enfermedad se descubrió a principios de los años 30 por Richard E. Shope que sugirió que la gripe debía estar causado por un virus, ya que podía transmitirse a través de filtros (Shope, 1931). Unos años después, en 1933, Wilson Smith, Sir Christopher Andrews y Sir Patrick Laidlaw consiguieron aislar por primera vez un virus de la gripe a partir de una persona infectada (Smith *et al.*, 1933). Desde ese primer aislado hasta nuestros días se han realizado multitud de estudios con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la biología del virus y de obtener antivirales o vacunas eficaces contra el mismo.

A pesar de ello, el virus de la gripe causa epidemias anuales y pandemias más graves cada cierto número de años. La principal dificultad que presenta el control eficaz de la infección es la enorme capacidad de variación del virus. Esta capacidad permite la rápida aparición de nuevas variantes antigénicas que son capaces de eludir la respuesta inmune del hospedador. Además, el virus presenta una alta capacidad de salto “interespecie”, siendo las aves su reservorio natural. Estas características, junto a su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, han hecho de los virus de la gripe uno de los patógenos conocidos con más morbilidad y mortalidad a lo largo de la historia (**Tabla In1**). La pandemia más letal conocida fue la denominada “gripe española” (H1N1) que duró

desde 1918 a 1919 y causó un número de muertes estimado entre 20 y 40 millones de personas en todo el mundo (Gibbs *et al.*, 2001a, b; Kawaoka *et al.*, 1989; Kilbourne, 2006). Posteriormente han aparecido nuevas pandemias cada cierto número de años, entre las que cabe destacar las de los años 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) y 1977 (H1N1). En el año 1997, apareció en humanos un nuevo subtipo aviar H5N1. Este virus se transmite de aves a humanos con una alta tasa de mortalidad, pero no ha adquirido todavía la capacidad de transmitirse eficazmente entre humanos (Hatta *et al.*, 2001). Más recientemente, en abril del 2009, se inició en México una nueva pandemia debida a un nuevo subtipo de origen porcino H1N1 que se transmitió por todo el mundo muy rápidamente debido a la alta transmisibilidad del virus y a la globalización.

Tabla In1. Pandemias de gripe más conocidas.			
Nombre de la Pandemia	Fecha	Nº de muertes	Subtipo
Gripe española	1918-1919	20-40 millones	H1N1
Gripe asiática	1957-1958	1 a 1,5 millones	H2N2
Gripe de Hong Kong	1968-1969	0,76 a 1 millones	H3N2
Gripe Porcina	2009-	14.711 (29/01/2010)	H1N1

Todos estos hechos hacen que tanto el estudio a nivel molecular, como el control epidemiológico del virus de la gripe sigan siendo de gran importancia.

1.2. Clasificación y nomenclatura.

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, que se caracteriza por tener envuelta lipídica y un genoma segmentado de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. Los virus de esa familia se dividen en varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta a humanos, algunos mamíferos y gran variedad de aves; *Influenzavirus B*, que infecta únicamente a humanos; *Influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus*, que incluye los virus Thogoto y Dhori; y el género *Isavirus*, cuyo componente más importante es el virus de la anemia del salmón.

Los virus clínicamente relevantes en humanos son los tipos A y B, pero únicamente los primeros han producido pandemias desde el siglo XX. Estos virus de tipo A se dividen en subtipos en base a la naturaleza antigénica de las glicoproteínas

hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Estos subtipos difieren en el rango de hospedador y la patogenicidad (Nicholls *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2006).

A lo largo de esta Tesis se va a hacer referencia únicamente al genero *Influenzavirus A*, ya que es el que afecta con mayor gravedad a las personas y constituye el principal modelo de estudio del laboratorio.

1.3. La partícula viral

Las partículas del virus de la gripe son pleomórficas, aunque con tendencia a adquirir formas esféricas, ovaladas o filamentosas según la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne *et al.*, 1960; Hoyle *et al.*, 1961) (**Figura In1A**). Los viriones tienen un diámetro entre 80 y 120 nm, aunque los filamentosos, que son los más frecuentes en preparaciones clínicas, pueden llegar a los 300nm de longitud. Poseen una envuelta lipídica derivada de la membrana plasmática de las células infectadas. A esta envuelta se anclan las glicoproteínas de membrana HA y NA, y en menor cantidad la proteína M2. La glicoproteína NA forma un homotetrámero con forma de bastón (Colman *et al.*, 1983; Varghese *et al.*, 1983), mientras que la proteína HA es un homotrímero con un extremo globular (Weis *et al.*, 1988). Ambas glicoproteínas forman espículas radiales de 10-14 nm en la superficie del virión. La proteína M2 está presente en forma de homotetrámero

(Holsinger & Lamb, 1991) formando canales iónicos en la superficie del virus (**Figura In1B**).

Bajo esta envuelta se encuentra el armazón proteico del virus formado principalmente por la proteína M1 y en menor medida y asociada a ésta, por la proteína NEP (antes denominada NS2) (Richardson & Akkina, 1991; Yasuda *et al.*, 1993). M1 es la proteína más abundante del virión e interacciona tanto con los tallos citoplasmáticos de las proteínas de la envuelta, como con las RNPs situadas en el interior (Enami & Enami, 1996; Ye *et al.*, 1987). Por el contrario la proteína NEP (*Nuclear Export Protein*) es la proteína estructural menos abundante y se ha descrito su implicación en la exportación de las RNPs al citoplasma (O'Neill *et al.*, 1998).

En el interior de la partícula viral se localiza el genoma segmentado del virus. El RNA viral se encuentra asociado a la proteína NP y unido por sus extremos al complejo de la polimerasa, formado por las proteínas PB1, PB2 y PA, formando unas estructuras denominadas ribonucleoproteínas (RNPs). Hay un total de 8 de estas estructuras, que son las encargadas de llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción.

Además el virus expresa cuatro proteínas no estructurales, NS1, PB1-F2, N40 y PA-X. NS1 se sintetiza a partir de transcrito primario del segmento 8 y se le atribuyen numerosas funciones regulatorias en distintas etapas de la

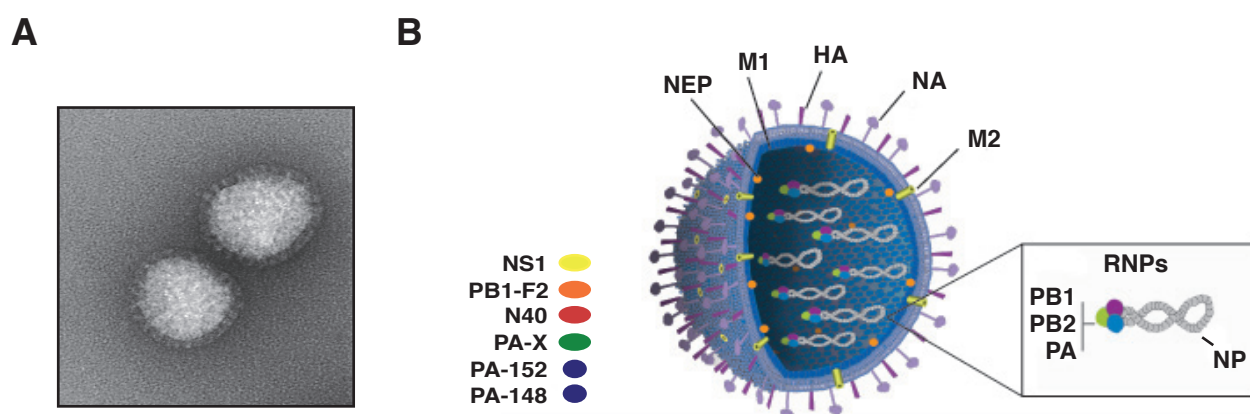


Figura In1. El virus de la gripe.

A) Micrografía electrónica de viriones purificados observados mediante tinción negativa por microscopía electrónica.

B) Representación esquemática de una partícula viral. El virión está compuesto por 9 de las 15 proteínas que codifica su genoma. Se muestran las 2 glicoproteínas de membrana, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el canal iónico M2, la proteína matriz (M1), la proteína NEP, la membrana viral, y las 8 RNPs. Cada RNP está compuesta por el RNA, NP y el complejo de la polimerasa, formado por las subunidades PA, PB1 y PB2. Se muestran también 6 de las proteínas no estructurales del virus (NS1, PB1-F2, N40, PA-X, PA-152 y PA-182).

infección y como factor clave en el bloqueo de la respuesta interferón (IFN). En el **apartado 5.2** se explicará con más detalle las funciones de esta proteína. La proteína PB1-F2 se ha descrito hace poco y se conocen muy pocas cosas de ella. Se localiza preferentemente en las mitocondrias y se ha relacionado con procesos de apoptosis (Chen *et al.*, 2001; Zamarin *et al.*, 2005) y con la regulación de la respuesta inmune celular. N40 se ha descubierto muy recientemente, y lo único que se conoce es que parece no ser esencial para el virus (Wise *et al.*, 2009). Hace pocos meses se ha publicado la caracterización de tres nuevas proteínas derivadas del segmento 3 del virus, PA-X, PA-152 y PA-182. PA-X modula la respuesta de la célula hospedadora y se la ha relacionado con la virulencia del virus (Jagger *et al.*, 2012). Por el momento se desconoce la función de PA-152 y PA-182, aunque se ha observado que en virus que

no expresan ambas proteínas, la patogenicidad y la replicación disminuye significativamente (Muramoto *et al.*, 2013).

1.4. Los RNAs virales.

El virus de la gripe A presenta un genoma segmentado formado por 8 moléculas de RNA de cadenas sencillas y polaridad negativa, cuya longitud oscila entre 2341 y 890 nucleótidos (Inglis *et al.*, 1976) (**Figura In2**). Estos segmentos no existen como RNAs desnudos sino que están asociados a las 4 proteínas virales que conforman las RNPs. El genoma completo del virus comprende alrededor de 13.500 nucleótidos según la cepa, y codifica un total de 15 proteínas. Cada segmento da lugar a una única proteína, excepto en el caso de los segmentos 2, 3, 7 y 8, que codifican más de una (Briedis *et al.*, 1981a; Chen *et al.*, 2001; Jagger *et al.*, 2012; Lamb & Choppin, 1979; Lamb & Lai, 1981; Lamb *et al.*, 1980, 1981; Muramoto *et al.*, 2013; Wise *et al.*, 2009). Los segmentos 7 y 8 dan lugar a dos proteínas cada uno mediante el procesamiento por *splicing* alternativo de sus mRNAs (proteínas M1 y M2, y NS1 y NEP respectivamente). El mRNA del segmento dos contiene tres pautas de lectura abierta que permiten la expresión de PB1, PB1-F2 y N40. Y el segmento tres presenta 2 pautas de lectura abierta que permiten la expresión de PA y PA-X. Además, a partir del mensajero de PA y utilizando codones AUG internos, se generan las proteínas PA-152 y PA-182.

Durante la infección por el virus de la gripe se pueden encontrar en el núcleo de la célula infectada cuatro tipos de RNAs virales generados por el complejo de la polimerasa viral (**Figura In3A-B**).

1.4.1. RNA genómico o viral (vRNA)

Constituye el RNA genómico del virus, de cadena sencilla y polaridad negativa. Son los RNAs presentes en las RNPs paternas y los que se ensamblan para dar lugar a las RNPs progenie. Sus extremos poseen un 5'-trifosfato y un 3'-OH (Young & Content, 1971). Todos los segmentos virales presentan unas secuencias conservadas de 12 y 13 nucleótidos en sus extremos 3' y 5' respectivamente (Desselberger *et al.*, 1980; Robertson, 1979), que poseen complementariedad parcial e invertida. Debido a esta característica, estos extremos forman una estructura en forma de *panhandle* o mango

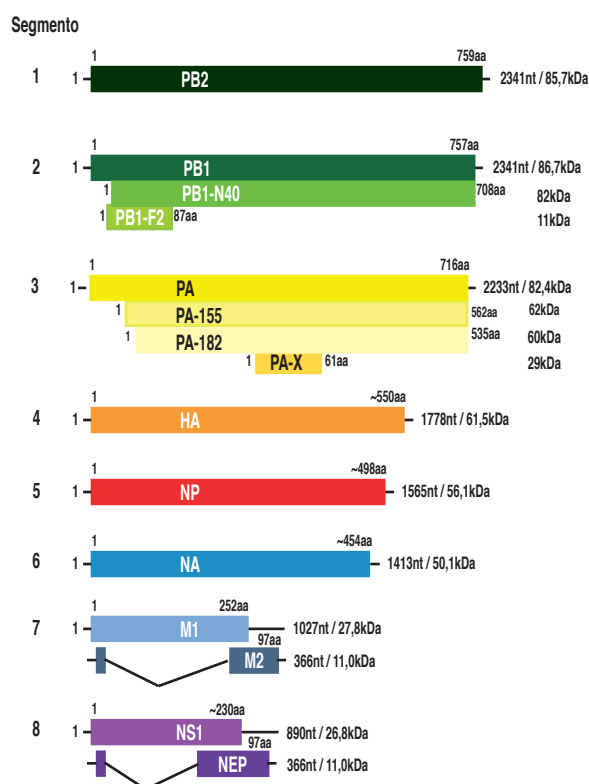


Figura In2. Estructura del genoma del virus de la gripe.

Los RNAs se representan en polaridad positiva, y se muestran las proteínas que codifican. A la izquierda se muestra el número de segmento. A la derecha su longitud en nucleótidos y la masa molar de las proteínas que codifican. Las líneas negras representan los extremos no codificantes de cada segmento. Los intrones se representan como líneas en forma de V en los segmentos M y NS (adaptado de Palese, P. & Shaw, 2007).

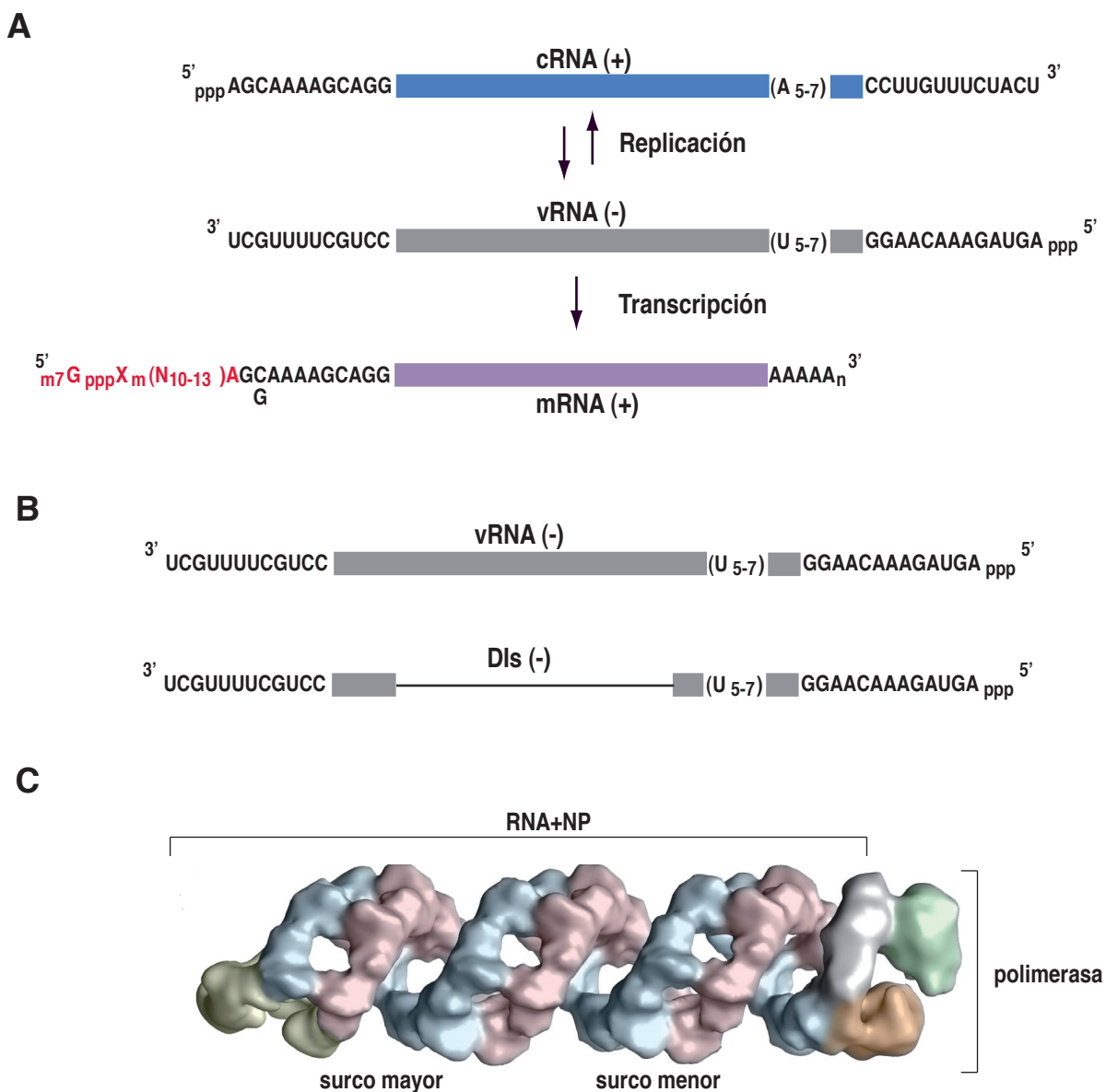


Figura In3.

A) Diagrama de la síntesis de RNA viral. El RNA genómico de polaridad negativa (vRNAs) con las secuencias no codificantes conservadas en cada extremo esta representado en gris. Mediante un proceso de transcripción se generan los mRNAs virales. El mRNA viral, representado en morado, contiene una estructura cap que proviene de los pre-mRNAs celulares y un extremo poli-A sintetizado por la polimerasa viral (mRNAs). Mediante un proceso de replicación se generan los intermediarios replicativos (cRNA), representado en azul, que son una copia exacta y de polaridad positiva del vRNA y sirven de molde para dar lugar a la progenie viral (vRNA). **B) Diagrama esquemático comparativo de un RNA DI y un vRNA.** En la figura se representa el RNA genómico (vRNA) y un RNA DI. Ambos RNAs tienen la misma estructura y polaridad, pero el DI contiene una delección interna de gran longitud representada por una línea negra. **C) Modelo tridimensional de la estructura de la RNP.** Modelo tridimensional de la estructura de una RNP de gripe. Se observa el complejo de la polimerasa unido en un extremo, y el RNA recubierto de NP formado un helicoide (Arranz *et al.*, 2012).

de sartén (Hsu *et al.*, 1987), que permite la conformación circular del RNA y forma el sitio de anclaje de la polimerasa (Fodor *et al.*, 1993, 1994; Honda *et al.*, 1987).

Estos extremos conservados constituyen el promotor viral, y son relevantes para los procesos de replicación, transcripción, poliadenilación y empaquetamiento. Los vRNAs contienen además

una zona rica en uridinas próxima al extremo 5', que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs virales (Luo *et al.*, 1991; Robertson, 1979). El resto del RNA se encuentra recubierto por monómeros de NP (Klump *et al.*, 1997) formando las ribonucleoproteínas virales o vRNPs (Arranz *et al.*, 2012; Coloma *et al.*, 2009; Martín-Benito *et al.*, 2001; Tiley *et al.*, 1994) (**Figura In3C**).

1.4.2. RNA complementario (cRNA)

Se produce durante la replicación viral a partir del vRNA. Son moléculas de polaridad positiva y copias completas del vRNA. Constituyen un paso intermedio de la replicación, sirviendo de molde para generar múltiples copias del vRNA progenie. Al igual que el vRNA, el cRNA se encuentra empaquetado por la polimerasa viral y por moléculas de NP formando RNPs. A diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo de la célula infectada y no se encapsidan (Shapiro *et al.*, 1987).

1.4.3. RNA mensajero (mRNA)

Se genera durante los procesos de transcripción a partir del vRNA. Son RNAs de polaridad positiva que presentan en sus extremos 5' una estructura *cap* de tipo 1 que deriva de los mRNA celulares (Krug *et al.*, 1979), y en su extremo 3' una secuencia poli-A de longitud variable. Ambas modificaciones post-transcripcionales dotan a los mRNAs virales de una estructura idéntica a la de los mRNAs celulares.

1.4.4. RNA defectivo interferente (DIs)

Cuando un virus de RNA es pasado seriadamente a alta multiplicidad de infección acumula gran cantidad de partículas defectivas interferentes (DIs) (Huang, 1977; von Magnus, 1951; Nayak *et al.*, 1978). Estas partículas son virus no infecciosos, defectivos, que interfieren con la normal replicación del resto de virus, pero que para su propia replicación requieren la presencia de un virus infeccioso homólogo (Huang, 1977). En el caso del virus de la gripe, este efecto se debe a la presencia de uno o varios RNAs de pequeño tamaño que derivan por delección de los segmentos de la polimerasa, PB1, PB2 y PA. Son RNAs de polaridad negativa con una estructura idéntica a la del vRNA pero de menor tamaño (**Figura In3B**) (Davis & Nayak, 1979; Davis *et al.*, 1980). Esta característica permite que puedan replicar y empaquetarse dentro del virión, aunque no expresan las proteínas correspondientes.

2. EL CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

El ciclo viral se desarrolla en células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados. Tiene una duración de entre 8 y 10 horas, y se encuentra muy bien regulado tanto espacial como temporalmente. Se pueden distinguir varias etapas que se describen a continuación (**Figura In4**).

2.1. Adsorción y entrada de la partícula viral en la célula

La adsorción del virus a la célula hospedadora está mediada por la interacción de la glicoproteína HA de la superficie del virus con los receptores celulares que contienen ácido siálico (Weis *et al.*, 1988) (**Figura In4-1**). Tras la adsorción, la entrada del virus se produce por endocitosis mediada por receptor en vesículas de clatrina (Matlin *et al.*, 1981). Una vez formada la vesícula, se produce su fusión con lisosomas, lo que permite la acidificación del interior y la formación de endolisosomas (**Figura In4-2**). El pH interno del virión disminuye progresivamente gracias al canal iónico que forma la proteína M2 (Pinto *et al.*, 1992) lo que produce la desestabilización de la interacción entre las RNPs y la proteína M1. Además, el pH ácido promueve un cambio conformacional de la proteína HA que favorece la fusión de la envuelta del virión con la membrana endolisosomal (Skehel *et al.*, 1995; Stegmann *et al.*, 1987a, b) (**Figura In4-3**). Una vez en el citosol, las RNPs libres de M1 son transportadas al núcleo gracias a la interacción de NP con la importina- α (Cros *et al.*, 2005; O'Neill *et al.*, 1995), donde tendrán lugar los procesos de replicación y transcripción virales.

2.2. Transcripción y replicación viral

Tras la entrada de las RNPs al núcleo, tiene lugar un primer paso de transcripción, que se conoce como transcripción primaria, y en el que se sintetizan cantidades similares de todos los mRNAs virales a partir de las vRNPs entrantes (Shapiro *et al.*, 1987) (**Figura In4-4**). Este paso no necesita la síntesis de nuevas proteínas virales. Los mRNAs recién sintetizados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular (**Figura In4-5**). Algunas proteínas virales recién sintetizadas son transportadas al núcleo y provocan el cambio de síntesis

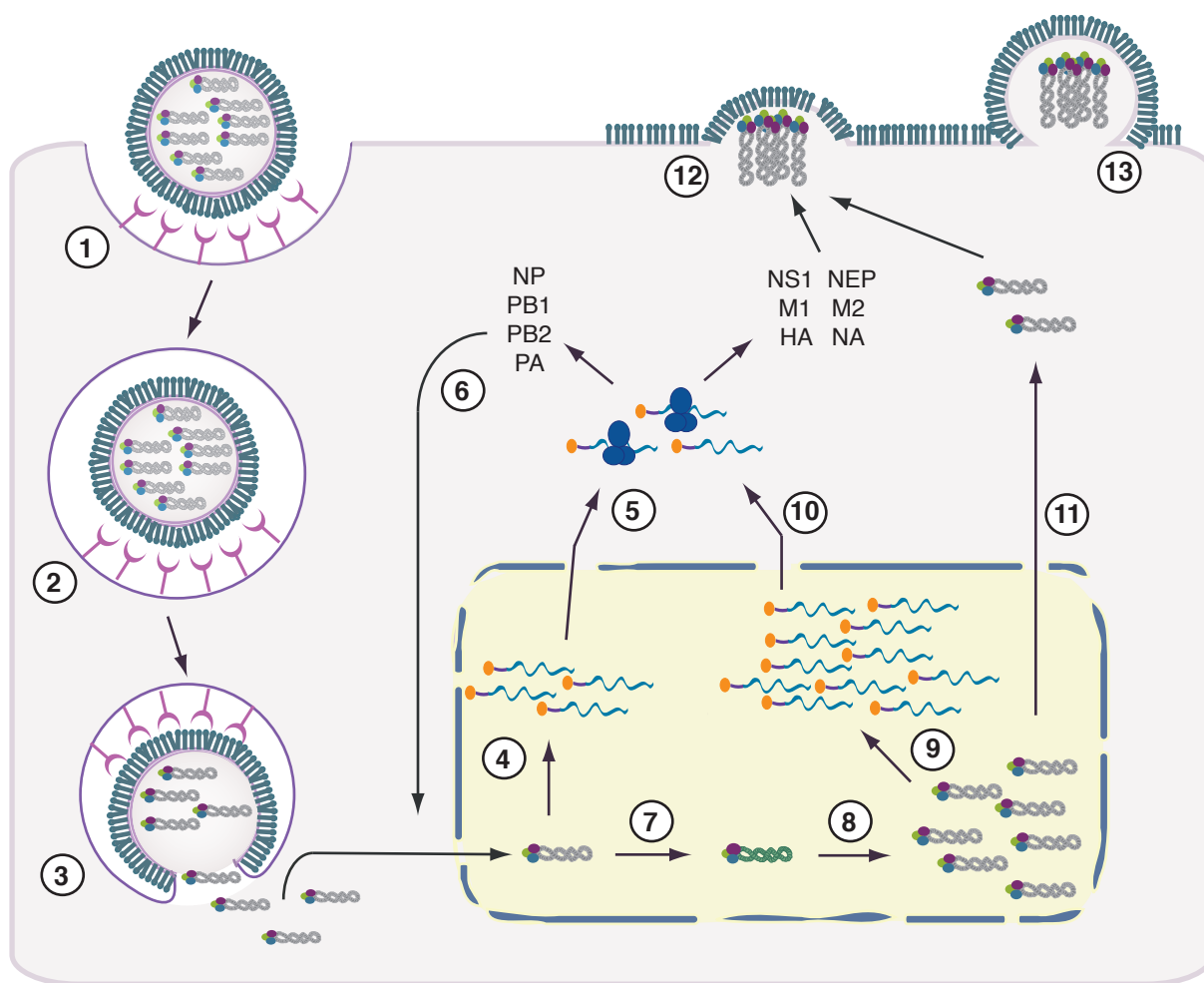


Figura In4. Ciclo de infección viral.

Esquema de los pasos de la infección del virus de la gripe. Se representan los mRNA virales en azul, las cRNPs en verde y las vRNPs en gris. **1)** Unión de la partícula viral a los receptores de ácido siálico de la superficie celular. **2)** Internalización del virus por endocitosis mediada por receptor. **3)** El bajo pH del interior desencadena la fusión de las membranas viral y endosomal, liberando las RNP al citoplasma. **4)** Las vRNPs se importan al núcleo donde sirven como molde para la transcripción. **5-6)** Las nuevas proteínas son sintetizadas desde el mRNA viral y transportadas al interior del núcleo. **7-8)** En la replicación del genoma se genera un intermediario de la replicación de polaridad positiva (cRNA) que sirve de molde para la generación de nuevas copias de vRNA. **9)** Transcripción secundaria para dar lugar a nuevos mRNAs virales. **10)** Estos mRNAs son transportados al citoplasma, y su traducción da lugar a las proteínas virales que van a ser empaquetadas en los nuevos viriones. **11)** Las nuevas RNP se exportan del núcleo al citoplasma y se transportan al sitio de ensamblaje. **12-13)** Formación de las nuevas partículas virales por gemación en regiones de *lipid rafts*.

transcripcional a la síntesis replicativa (**Figura In4-6**). En una primera ronda de replicación se producen cantidades equivalentes de los cRNAs de cada segmento (**Figura In4-7**). Los cRNAs actúan como intermediarios de la replicación sirviendo de molde para la generación de nuevas vRNPs (**Figura In4-8**). Esta amplificación tiene lugar de manera diferencial en cada segmento (Smith & Hay, 1982). En las fases tempranas de la infección (hasta 3 hpi) se sintetizan grandes cantidades de vRNA de los segmentos NP y NS, mientras que en las fases tardías se sintetizan predominantemente de M, NA y HA. Durante el proceso de transcripción secundaria se sintetiza mRNA a partir del vRNA de nueva síntesis, y se

cree que tanto su acumulación como la formación de nuevas proteínas son correlativas con la generación del vRNA del que proceden (Hay *et al.*, 1977; Krug *et al.*, 1989; Smith & Hay, 1982) (**Figura In4-9/10**).

2.3. Procesamiento de mRNAs virales y síntesis de proteínas

Los productos de transcripción primarios al vRNA de los segmentos M y NS codifican las proteínas M1 y NS1 respectivamente. Estos transcritos pueden ser procesados para dar lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP (Inglis & Brown, 1981; Inglis *et al.*, 1979;

Lamb & Choppin, 1979; Lamb *et al.*, 1981). Es la maquinaria de *splicing* de la célula hospedadora la que elimina los intrones de estos segmentos. En el segmento M existe un segundo sitio de *splicing* que genera el mRNA3, que tan solo codifica 9 aminoácidos, y cuyo producto de traducción no ha sido identificado por el momento (Shih *et al.*, 1995). El proceso de *splicing* se encuentra altamente regulado. La relación de acumulación de los mRNAs NS1/NEP y M1/M2 varía a lo largo de la infección y parece que la proteína NS1 podría tener un papel clave en esta regulación (Fortes *et al.*, 1994; Garaigorta & Ortín, 2007; Robb & Fodor, 2012; Robb *et al.*, 2010; Smith & Inglis, 1985; Valcárcel *et al.*, 1991).

Los mRNAs virales, tras exportarse al citoplasma, deben competir con los mensajeros celulares por la maquinaria de traducción. La síntesis de proteínas virales es un proceso muy regulado. Aunque no está claro el mecanismo, el transporte de los mRNAs virales desde el núcleo al citosol es un proceso muy eficiente (**Figura In4-5/10**). Además, la síntesis de proteínas celulares se encuentra prácticamente inhibida, en un proceso conocido como *shut-off*, lo que permite al virus disponer de la maquinaria de traducción (Garfinkel & Katze, 1992). La proteína NS1 tiene una papel clave en esta estimulación transcripcional. Para ello actúa a varios niveles: regula la actividad de la polimerasa viral y el procesamiento de los mensajeros virales y celulares, inhibe el corte y poliadenilación de mensajeros celulares, promueve la retención nuclear y la degradación de mensajeros celulares poliadenilados, y estimula la traducción de los mensajeros virales (Aragón *et al.*, 2000; Chen & Krug, 2000; Falcón *et al.*, 1999, 2004; Fortes *et al.*, 1994; Marión *et al.*, 1997a, b; Yángüez & Nieto, 2011).

2.4. Formación de nuevas partículas virales

En la fase tardía del ciclo de infección comienza la formación de partículas virales, proceso que se produce por gemación en la membrana plasmática. Por lo tanto, los distintos componentes estructurales del virus deben confluir en un mismo punto. Las vRNPs progenie son exportadas desde el núcleo hasta el citosol a través del poro nuclear (**Figura In4-11**). En este proceso tienen un papel clave la proteína M1, que actúa de puente entre las RNPs y NEP, y esta

última, que interacciona con los componentes del poro nuclear (O'Neill *et al.*, 1998). Una vez que las vRNPs se encuentran en el citoplasma son transportadas hasta la membrana plasmática celular a través de filamentos de actina (Avalos *et al.*, 1997; Digard *et al.*, 1999). Estos complejos se dirigen a regiones concretas de la membrana plasmática ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Zhang *et al.*, 2000). En esta región también confluyen las proteínas HA, NA y en menor medida M2 (Nayak *et al.*, 2004; Scheiffele *et al.*, 1999; Simpson-Holley *et al.*, 2002)(**Figura In4-12**). La encapsidación de las RNPs parece que está dirigida por la proteína M1 (Gómez-Puertas *et al.*, 1999; Latham & Galarza, 2001), que además actuaría como puente entre las vRNPs y las proteínas de la envuelta HA, NA y M2. Tanto las glicoproteínas (Chen *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2000) como la proteína M2 (Iwatsuki-Horimoto *et al.*, 2006; McCown & Pekosz, 2006) también están involucradas en este proceso. La liberación de las partículas tiene lugar mediante un proceso de *budding* o gemación (**Figura In4-13**). Para la liberación final de las partículas se requiere la acción catalítica de la proteína NA que degrada el ácido siálico de los receptores celulares, lo que evita la agregación de los virus y permite su dispersión.

Se han propuesto dos modelos para explicar cómo el genoma segmentado del virus de la gripe, formado por 8 vRNPs, es empaquetado en los nuevos viriones: un modelo al azar, y un modelo de empaquetamiento selectivo. El primero asume que los diferentes segmentos se incorporan dentro del virión de forma arbitraria, y se apoya en la observación de viriones con un número superior de vRNPs (9-11) (Bancroft & Parslow, 2002; Enami *et al.*, 1991). El segundo modelo propone que cada una de las vRNPs posee señales específicas que las diferencian del resto y que permiten el empaquetamiento de ocho RNPs diferentes en cada virión. Existen numerosas evidencias que apoyan este último modelo. Por una parte, la cantidad de cada vRNP en los viriones es equimolar, aunque la acumulación de las mismas en las células es muy diferente (Smith & Hay, 1982). Además, los vRNAs de DIs compiten con la incorporación de su vRNA homólogo, y no con el de otros segmentos (Duhaut & McCauley, 1996; Nayak *et al.*, 1982). Recientemente se han identificado secuencias en *cis* presentes en las regiones codificantes y no codificantes de los extremos 5' y 3' de todos los segmentos que son

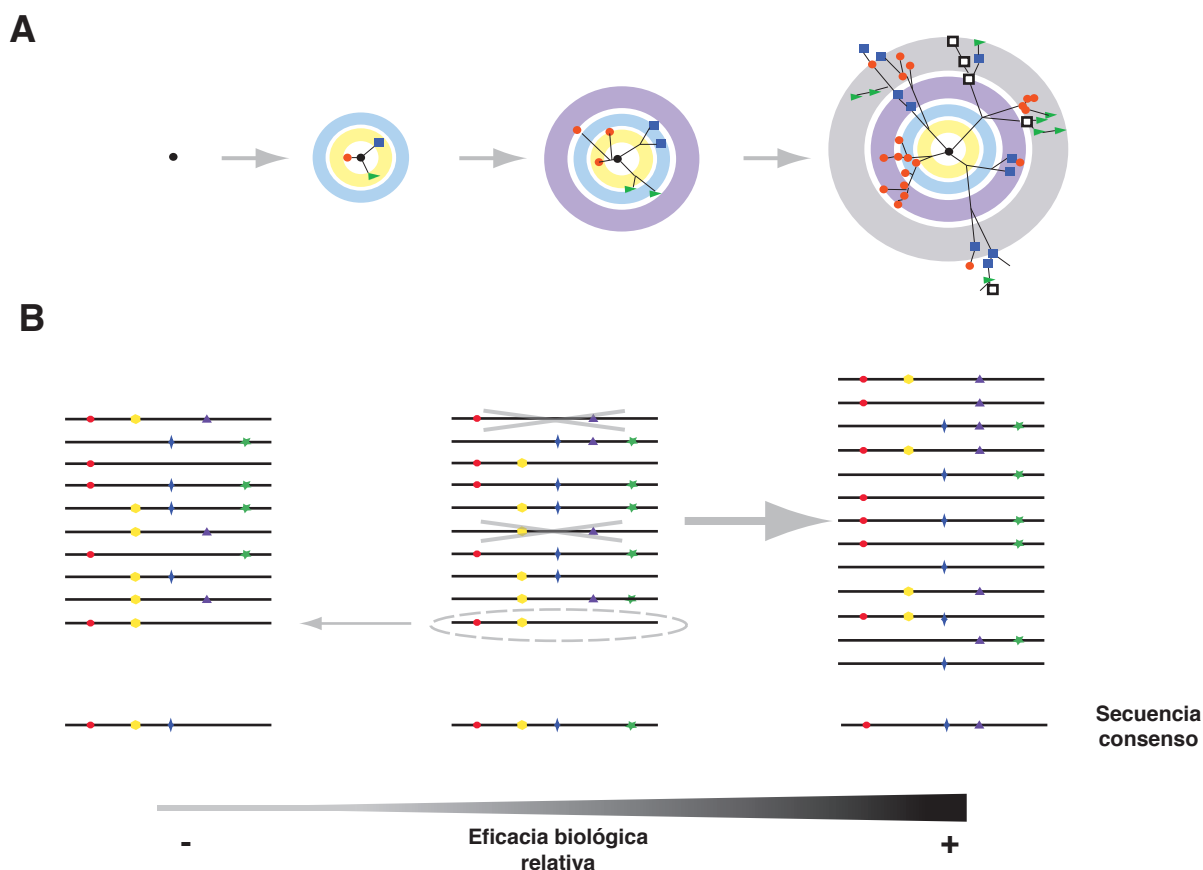


Figura In5.

A) Esquema de la generación de mutaciones en la replicación de virus RNA. Los virus RNA existen como cuasiespecies. Un virus con una alta tasa de mutación genera un repertorio de mutantes diversos después de un pequeño número de ciclos de replicación consecutivos. En este esquema simplificado, las líneas negras representan las conexiones entre los virus, los símbolos nuevas mutaciones, y cada círculo concéntrico un nuevo ciclo de replicación (adaptado de Lauring & Andino, 2010). **B) Esquema de la estructura en cuasiespecies de los virus RNA.** En el esquema se representa una distribución heterogénea de los genomas, típica de los virus RNA. Las líneas representan genomas virales, y los símbolos mutaciones. Debajo de cada espectro de mutantes se indica la secuencia consenso. La cuasiespecie inicial (centro) puede evolucionar hacia un aumento de eficacia biológica (flecha ancha, derecha) al ser sometida a pases con grandes tamaños poblacionales, o hacia disminuciones de eficacia biológica (flecha pequeña, izquierda) al ser sometida a cuellos de botella sucesivos o pases placa a placa. Los pases con grandes tamaños de población favorecen la competición entre variantes y conllevan un aumento de la eficacia biológica relativa, mientras que los cuellos de botella aumentan la probabilidad de acumulación de mutaciones deletéreas.

necesarias para el empaquetamiento (Fujii *et al.*, 2005, 2003; Liang *et al.*, 2005, 2008; Muramoto *et al.*, 2006; Noton *et al.*, 2007; Ozawa *et al.*, 2009). Por último, existen evidencias estructurales provenientes de cortes seriados de viriones durante el proceso de gemación, en donde se ha observado una distribución constante de 7 vRNPs, en forma de anillo alrededor de una vRNP central (Noda & Kawaoka, 2010; Noda *et al.*, 2006).

Cabe destacar, que tanto la forma como el tamaño de las nuevas partículas virales parece estar determinado por la proteína M1. Mutaciones puntuales en esta proteína provocan un cambio

de morfología de filamentoso a esférico o viceversa (Bourmakina & García-Sastre, 2003; Burleigh *et al.*, 2005; Hughey *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2002; Roberts & Compans, 1998), lo que puede tener implicaciones en el título viral.

3. CUASIESPECIES

Como se ha indicado antes, la polimerasa viral es la encargada de llevar a cabo la replicación del genoma. En general, las RNA polimerasas dependientes de RNA carecen de los mecanismos de corrección de errores que poseen las DNA polimerasas (Bressanelli *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 1997). Además, no existen mecanismos

conocidos de reparación post-replicación (Modrich & Lahue, 1996). Estas características hacen que los genomas de RNA presenten tasas de mutación muy altas (Drake, 1993; Holland *et al.*, 1992; Mansky & Temin, 1995). En el caso del virus de la gripe es de 10^{-4} - 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado (Suárez *et al.*, 1992). A este hecho hay que añadir que este tipo de virus presentan tamaños de población grandes (10^7 - 10^9 ufp/ml) y ciclos de replicación cortos, lo que permite que en cada ronda de replicación puedan aparecer varias mutaciones (**Figura In5A**). El resultado es una población de virus que no posee un único genotipo. En vez de ser homogénea, está compuesta por un conjunto de secuencias similares pero no idénticas, relacionadas genéticamente y que han sido originadas por mutación. A este conjunto de secuencias diversas se le denomina cuasiespecie (Domingo & Holland, 1997; Domingo *et al.*, 1978; Eigen, 1993; Holland *et al.*, 1982, 1992), término que inicialmente se acuñó para explicar la evolución de los replicones de RNA antes de la aparición de las células (Eigen, 1971). Teniendo en cuenta todas las variantes, para cada población viral se puede asignar una secuencia consenso o promedio que se obtiene al asignar a cada posición del genoma el nucleótido más frecuente dentro de población. De esta forma pueden existir dos poblaciones virales que a pesar de tener la misma secuencia consenso, estén compuestas por variantes diferentes (**Figura In5B**).

Los diferentes genomas que forman la cuasiespecie interactúan cooperativamente a nivel funcional, y colectivamente contribuyen a las características de la población. Estas secuencias se encuentran sujetas a una continua variación genética, y sufren procesos de competición y selección entre ellas. Se genera un equilibrio entre la generación de nuevos mutantes, la eliminación por selección negativa de variantes que son deletéreas o tienen una menor eficacia biológica, y la selección de los mejor adaptados. Estos procesos conducen a la optimización de la cuasiespecie, que alcanza un equilibrio. Es sobre la población en conjunto sobre la que actúa la evolución molecular de los virus.

La teoría de las cuasiespecies tiene importantes implicaciones en la adaptación, virulencia, patogenicidad y resistencia de los virus a compuestos antivirales.

La gran diversidad genética de la población es una de las razones que explican la gran adaptabilidad que presentan los virus RNA, ya que supone un enorme reservorio de variantes. Los fenotipos de dichas variantes pueden ser vitales en caso de ambientes cambiantes o situaciones de estrés. Hay numerosos estudios sobre el comportamiento de las poblaciones virales ante resistencia a antivirales, evasión de la respuesta inmune, cambio de huésped o tropismo (Borrego *et al.*, 1993; Domingo & Holland, 1992; Vignuzzi *et al.*, 2006). En estos casos, se produce un cuello de botella, donde sólo algunas de las variantes minoritarias de la población son seleccionadas, produciéndose una rápida evolución de la cuasiespecie desde ese punto hasta un nuevo equilibrio (**Figura In5B**).

4. RESPUESTA INMUNE INNATA CELULAR

Cuando un patógeno infecta una célula desencadena la activación de una respuesta inmune innata, que tiene lugar mucho antes de que la inmunidad adaptativa actúe en el organismo. Uno de los componentes principales de esta respuesta es un grupo de citoquinas conocidas genéricamente como Interferones de Tipo I (IFN). Estas moléculas tienen una función señalizadora que activa una cascada de transducción de señales en las células. De esta forma, se induce la expresión de cientos de genes celulares cuya función es evitar la multiplicación y dispersión de los virus. El sistema IFN es una poderosa respuesta antiviral, que es capaz de controlar la mayoría de las infecciones en ausencia de inmunidad adaptativa. A continuación se explicará con detalle esta respuesta (**Figura In6**).

4.1. Reconocimiento celular de la presencia de patógenos (PAMPs)

El primer paso para la inducción de IFN y la activación de la cascada es el reconocimiento del patógeno dentro de la célula. El sistema innato se basa en el reconocimiento de moléculas que son comunes para varios tipos de patógenos y que sin embargo no están presentes en la célula huésped. Estos componentes se conocen conjuntamente con el nombre de immunoestimulantes asociados a patógenos o PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). En el caso de los virus,

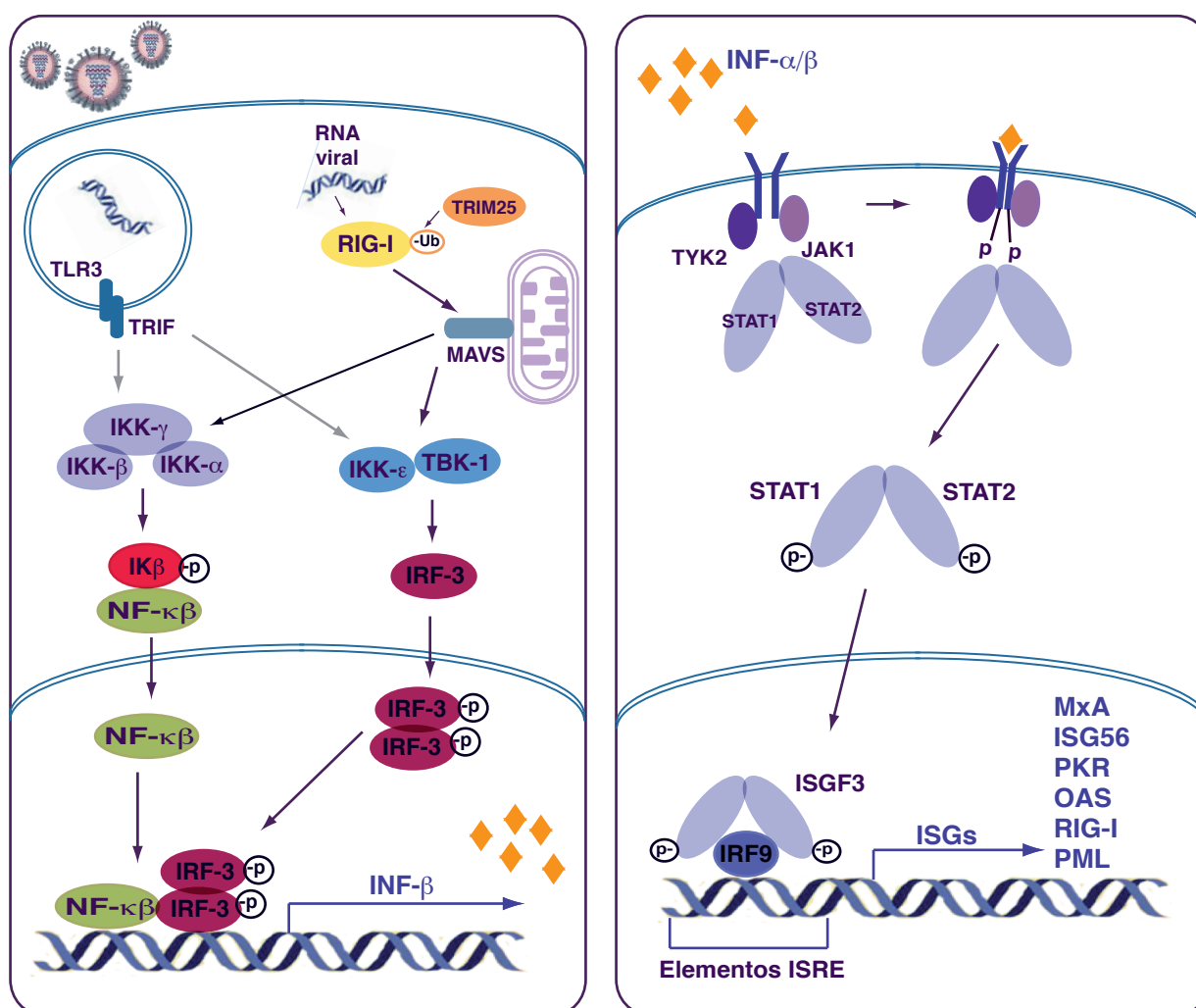


Figura In6. Respuesta del sistema celular innato a la infección por gripe.

Panel izquierdo: Representación de la cascada de señalización desde el reconocimiento de la presencia del virus hasta la producción de IFN. Se indican las proteínas sensoras (RIG-I y TLR3), las proteínas adaptadoras o transductoras de la señal (MAVS, TRIF, TBK1, ...) y los factores de transcripción relevantes (IRF-3 y NF-κβ). La activación de estas cascadas concluye con la inducción de la expresión de IFN-β. **Panel derecho:** Representación de la respuesta inducida por IFN. Se muestra el receptor de IFN (IFNR), las proteínas adaptadoras TYK2 y JAK1, y los factores de transcripción STAT1, STAT2. La activación de esta cascada induce la expresión de genes ISGs (*Interferon Stimulated Genes*).

tradicionalmente se ha pensado que estos inductores eran moléculas de RNA de doble banda (dsRNA) producidas en la replicación viral (Marcus & Sekellick, 1977; Marcus, 1983). En los últimos años se ha descrito que RNA con extremos 5' trifosfato y regiones parciales de doble banda es también un buen inductor (Cui *et al.*, 2008; Takahasi *et al.*, 2008). Además, se ha relacionado la presencia de DIs en muchos virus con la inducción de IFN (Baum *et al.*, 2010; Killip *et al.*, 2013; Strahle *et al.*, 2006).

Los PAMPs son reconocidos como extraños por receptores celulares específicos (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*), que son los encargados de unir dichas moléculas y activar la respuesta. Entre dichos receptores se encuentra la familia

TLRs (*Toll-Like Receptors*) en compartimentos endosomales, y la familia RLRs (*RIG-I like receptors*) que son citoplasmáticos. A este último grupo pertenecen las proteínas RIG-I, MDA-5 y LGP2. Estos receptores presentan diferencias en cuanto a sustrato y virus reconocido (revisado en Rehwinkel, 2010) y únicamente RIG-I parece ser relevante en la infección de células epiteliales por el virus de la gripe (Guo *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2006; Mibayashi *et al.*, 2007; Opitz *et al.*, 2007). En experimentos de diferentes grupos, se ha analizado el RNA unido a RIG-I en células infectadas por gripe mediante *primer extension*, *Northern-blot* o ultrasecuenciación, y en todos los casos se encontró RNA genómico del virus (Baum *et al.*, 2010; Rehwinkel *et al.*, 2010). Además,

varios estudios apuntan a que este sensor tendría predilección por RNA de doble banda con extremos 5' trifosfato, aunque no está claro todavía qué molécula actúa como PAMP en gripe (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). En los últimos años se ha determinado la estructura de varios dominios de RIG-I lo que probablemente permitirá entender mejor el mecanismo de activación de este factor, así como su sustrato (Civril *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2011; Kowalinski *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011). RIG-I es un punto clave de la cascada de IFN, por lo que su activación se encuentra altamente regulada. Además de la unión a RNA, RIG-I tiene que ser ubiquitinado por la enzima TRIM25 para su activación (Gack *et al.*, 2007). Recientemente se ha descrito que la enzima Riplet (o RNF135) también puede realizar esta ubiquitinación (Oshiumi *et al.*, 2009, 2010). Aparte, existen una serie de reguladores negativos que inhiben su función, como es el caso de los factores A20 y RNF125 (Arimoto *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2006).

4.2. Inducción de la expresión de interferón

Cuando RIG-I reconoce RNA viral en el citoplasma se desencadena una cascada de señalización que finaliza con la expresión de IFN. El primer paso es el reclutamiento y activación de la proteína mitocondrial MAVS (también conocida como VISA, IPS1 y Cardif) (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). La interacción con MAVS provoca la inducción de forma independiente de las vías de IRF3 y de NF- κ B. La primera vía comienza con la activación de las quinasas TBK1 y IKK ϵ por MAVS, lo que desencadena la fosforilación del factor de transcripción IRF3, que dimeriza, y se transloca al núcleo. En la segunda vía participan las quinasas IKK clásicas (IKK- $\alpha/\beta/\gamma$) que inducen la activación y translocación del factor NF- κ B. Para ello fosforilan a su inhibidor, IKB, lo que permite la liberación de NF- κ B. Una vez en el núcleo, los factores IRF3 y NF- κ B forman un complejo que activa la expresión de determinados genes entre los que se encuentra los de INF- β o IFN- α . De esta forma se produce la primera oleada de INF de tipo I (revisado en Wolff & Ludwig, 2009) (Figura In6, panel izquierdo).

4.3. Reconocimiento celular de interferón

Posteriormente a su síntesis, el IFN es secretado al exterior celular donde actúa de forma autocrina y paracrina activando una segunda cascada de señalización al unirse a su receptor IFNAR (*Type I IFN Receptor*). La señal es transmitida mediante la vía JAK/STAT hasta el núcleo. En resumen, todos los tipos de IFN se unen al mismo receptor heterodimérico IFNAR compuesto por las proteínas IFNAR1 y IFNAR2. Estas proteínas se encuentran unidas en el interior celular a las tirosina quinasas Tyk2 y JAK1 respectivamente. Además el activador de la transcripción STAT2 se encuentra también unido a este complejo, y a su vez débilmente a STAT1. La unión de IFN al receptor provoca la dimerización del mismo y una cascada de fosforilaciones cruzadas que termina con activación de STAT2 y STAT1, y la translocación al núcleo de ambas proteínas en forma de dímero. Allí interacciona con el factor IRF9 formando así el complejo ISGF3, que se une a promotores con elementos ISRE (*IFN-Stimulated Response Elements*). De esta forma se activa la transcripción de cientos de genes dependientes de IFN o ISGs (*IFN-dependent genes*), creando así un estado antiviral tanto en la célula infectada como en las células vecinas sin infectar (revisado en Randall & Goodbourn, 2008) (Figura In6, panel derecho). Además, se ha descrito que tanto el heterodímero STAT1/STAT2, como el homodímero STAT1, son capaces de unirse independientemente del factor IRF9 a elementos GAS (*Gamma Activated Sequence elements*). De esta forma se activa la expresión de algunos genes como el de IRF1, aunque estos son diferentes a los que se activan en respuesta a IFN- γ (Haque & Williams, 1994; Li *et al.*, 1996). Para devolver a la célula a su estado normal después de la activación, existen numerosos mecanismos que en su mayoría actúan desfosforilando las proteínas STAT. Un ejemplo de ello son los factores PIAS y SOCS (Valentino & Pierre, 2006; Yoshimura *et al.*, 2007).

4.4. Respuesta antiviral mediada por interferón

Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento de las células con IFN- α/β induce la expresión de cientos de genes celulares cuya función principal es evitar la multiplicación y dispersión de los virus, generando así un estado

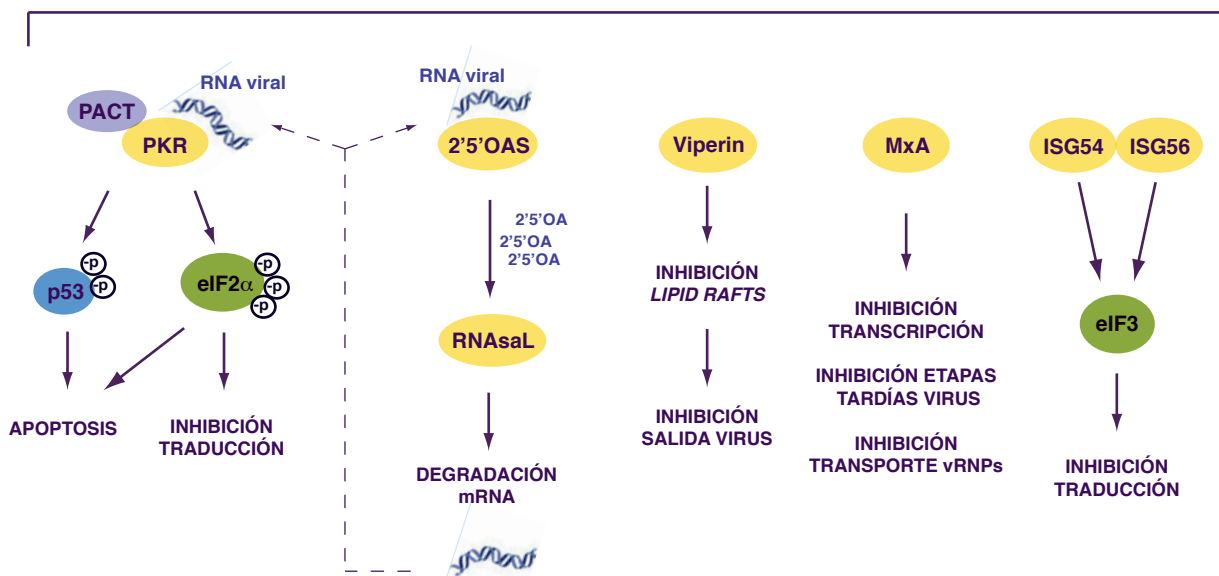
INF- α/β 

Figura In7. Actividad antiviral de las enzimas y factores inducidos por IFN.

Esquema que representa las diferentes cascadas y funciones antivirales inducidas por IFN. En amarillo se muestran las diferentes enzimas y factores que se expresan en la respuesta inducida por IFN. Las flechas indican activación.

antiviral en la célula. Los productos de estos genes tienen funciones importantes y en su conjunto afectan prácticamente a todas las etapas y procesos claves del ciclo viral. Ninguno tiene un papel principal, aunque dependiendo del virus, cepa y tipo celular, alguno de estos genes puede tener mayor relevancia en el bloqueo de la infección. A continuación, se explican con detalle algunas de estas enzimas y factores (**Figura In7**).

- PKR (Protein Kinase R): La proteína PKR es una treonina-serina quinasa con varias funciones en el control de la transcripción y traducción celular. Tradicionalmente se ha considerado que esta proteína se activa mediante unión a dsRNA lo que permite su dimerización, aunque en los últimos años se ha descrito que moléculas de ssRNA estructuradas con un grupo trifosfato 5' podrían actuar como activadores (Nallagatla *et al.*, 2007). Otra ruta alternativa de activación es mediante la interacción con el factor PACT (PKR-Activating Protein) (Clemens & Elia, 1997; Galabru & Hovanessian, 1987; Ito *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2000). El principal sustrato de PKR es la subunidad α del factor eIF2 (eIF2 α). La fosforilación por PKR impide el proceso normal de reciclaje de este factor,

inhibiéndose así tanto la traducción celular como viral. Se ha descrito que la fosforilación de eIF2 α está también implicada en la inducción de autofagia (Espert *et al.*, 2007; Tallóczy *et al.*, 2002). Además se ha propuesto la participación de PKR en otros mecanismos antivirales como la inducción de apoptosis y la parada del ciclo celular. Varios virus son capaces de inducir apoptosis por un proceso dependiente de PKR (Balachandran *et al.*, 2000; Gaddy & Lyles, 2007; Zhang & Samuel, 2007), en el que el factor eIF2 α parece ser clave (Gil *et al.*, 1999; Scheuner *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 1998). Además, el factor pro-apoptótico p53 (apoptosis-activating gene) puede ser fosforilado por PKR, quien también induce su actividad (Cuddihy *et al.*, 1999a, b). Debido a sus funciones, la actividad de PKR está muy regulada dentro de la célula. Además de su inducción por PACT, existe un inhibidor específico de su actividad denominado P58(IPK) (factor inhibitorio de PKR).

- 2'-5'OAS (2'-5' oligo (A) synthetase): Al igual que PKR, este factor se sintetiza en su forma inactiva, y utiliza dsRNA como cofactor. Una vez activada, esta enzima induce la síntesis de 2'-5' OA (2'-5' oligo adenylate). Esta molécula se une y activa la proteína inducible por IFN RNAsaL. Se trata de una enzima que degrada mRNA tanto viral como celular. Se ha descrito

que los RNAs de pequeño tamaño resultantes de esta degradación serían capaces de estimular RIG-I y MDA-5, induciendo y amplificando la respuesta IFN (Malathi *et al.*, 2007). Además, esta enzima también está implicada en la inducción de apoptosis.

- **Proteínas Mx:** Las proteínas Mx son otros de los productos que se inducen por IFN. Se trata de una serie de GTPasas pertenecientes a la superfamilia de la dinaminas (Arnheiter *et al.*, 1996; Horisberger, 1995). En humanos existen dos proteínas de esta familia, MxA que se localiza en el citoplasma y ha sido ampliamente estudiada, y MxB situada en el citoplasma y en el núcleo (Frese *et al.*, 1996; Haller *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2001; Melén & Julkunen, 1997; Pavlovic *et al.*, 1990). La proteína MxA tiene un importante efecto antiviral contra gran variedad de virus de RNA, impidiendo por ejemplo la replicación del virus de la gripe. Se cree que esta proteína interfiere con el tráfico o actividad de las polimerasas virales (Stranden *et al.*, 1993). MxA específicamente se une a las ribonucleoproteínas del virus Thogoto bloqueando su transporte al núcleo (Kochs & Haller, 1999). La proteína Mx1 murina inhibe la transcripción primaria del virus de la gripe, mientras que la isoforma humana MxA actúa en el citoplasma inhibiendo etapas tardías del ciclo viral (Pavlovic *et al.*, 1992). Recientemente se ha descrito la interacción de MxA con la proteína de gripe NP presente en las vRNPs. Esta interacción induce el auto-ensamblaje de MxA en anillos, provocando la formación de un complejo oligomérico altamente estructurado que bloquea el transporte al núcleo de las vRNPs entrantes, impidiendo así la replicación viral (Daumke *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011).

- **ISG15, ISG54 y ISG56:** Además de las enzimas clásicas hay muchos otros genes cuya expresión se ve fuertemente inducida en respuesta a IFN. Estos genes se nombraron según el peso molecular de la proteína (ISG54, proteína de 54 kDa inducida por IFN). El gen ISG15 es uno de los más importantes. Codifica una proteína de tamaño muy pequeño, relacionada con la ubiquitina, y que al igual que ésta, se une covalentemente a muchas proteínas celulares regulando su función en un proceso conocido como ISGilación (Giannakopoulos *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; revisado por Kerscher *et al.*, 2006). Además, esta proteína puede ser secretada por las células como citoquina modulando la respuesta inmune (D'Cunha *et al.*, 1996). Se cree

que actúa regulando positivamente la eficiencia de la respuesta IFN de forma global. De hecho, muchos de los substratos de ISG15 tienen una función clave en esta respuesta. Cabe destacar entre ellos las proteínas JAK1, Erk1, STAT1, PKR, MxA, RIG-I y IRF3 (Lu *et al.*, 2006; Zhao, 2005). Se cree que la unión de este ligando estabilizaría a estas proteínas contra la degradación. Ratones en los que el gen ISG15 se ha eliminado son más susceptibles a infecciones por el virus de la gripe A y B (Lenschow *et al.*, 2007). También se ha demostrado esta inhibición en células humanas (Hsiang *et al.*, 2009). Cabe también destacar que ISG15 se conjuga a la proteína NS1 del virus de la gripe inhibiendo su función (Tang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010). Por otra parte, ISG54 y ISG56 son dos proteínas relacionadas que inhiben la traducción mediante la interacción con el complejo de iniciación de la traducción multiproteico eIF3.

- **Viperin:** La proteína viperin, también conocida como cig5 (*CMV-Inducible gene 5*) tiene igualmente un papel importante en la respuesta antiviral inducida por IFN (revisado en Fitzgerald, 2011). La expresión de esta proteína en un sistema celular ha demostrado que tiene una fuerte actividad antiviral contra varios virus como HCMV, HCV, HIV, alphavirus y gripe (Chin & Cresswell, 2001; Helbig *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Aunque el mecanismo de acción de esta proteína no está claro, recientemente se ha descrito que afecta a la formación de *lipid rafts* mediante su unión a la membrana plasmática y la inhibición de la enzima encargada de la biosíntesis de lípidos derivados de isoprenoides, lo que produce cambios en la fluidez de la membrana (Wang *et al.*, 2007). Como se ha descrito anteriormente, la formación de los *lipid rafts* es un proceso clave en la gemación y salida de muchos virus, incluido el de la gripe.

5. MECANISMOS DE BLOQUEO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR EL VIRUS

5.1. Estrategias de bloqueo de la respuesta interferón mediadas por virus.

Como se ha explicado anteriormente, el sistema IFN es una poderosa herramienta antiviral. A pesar de ello, los virus siguen causando infecciones y enfermedades. Esto es

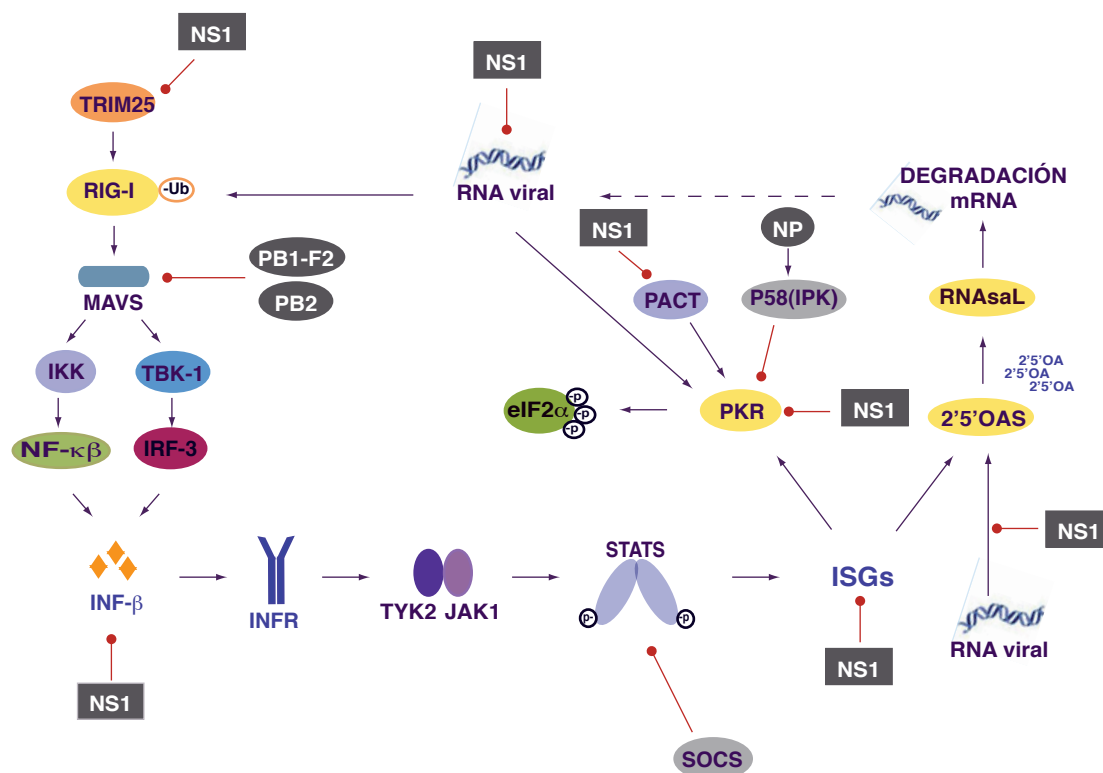


Figura In8. Mecanismos de bloqueo de la respuesta IFN por parte del virus de la gripe.

El virus de la gripe inhibe la respuesta IFN a diferentes niveles. Usando proteínas virales (gris oscuro) o proteínas celulares (gris claro). Los pasos de activación se indican con flechas negras, y los de inactivación con flechas rojas terminadas en punto. La proteína NS1 secuestra el RNA viral, impidiendo la activación de RIG-I, PKR y OAS. Esta proteína también une e inhibe a TRIM2, PKR y PACT. En el núcleo, NS1 previene el procesamiento y transporte de los mRNAs celulares, inhibiendo la síntesis de IFN e ISGs. Las proteínas PB2 y PB1-F2 inhiben la función de MAVS en la mitocondria. Los factores celulares SOCS y P58(IPK) son inducidos durante la infección viral, e inhiben respectivamente la señalización de IFN via STATS y la activación de PKR (García-Sastre, 2011).

debido a que la mayoría de los virus han desarrollado estrategias para bloquear o atenuar esta respuesta, lo que abre una ventana que les permite replicarse dentro del huésped y transmitirse con una eficacia razonable. De hecho, en gran parte la virulencia de un virus depende de la eficacia en este bloqueo (Randall & Goodbourn, 2008).

De forma general, los mecanismos que usan los diferentes virus para evadir la respuesta IFN se pueden clasificar en 5 tipos:

1. Bloqueo de la expresión de genes celulares y/o la síntesis de proteínas.
2. Disminución de la producción de IFN al limitar la generación de PAMPs y/o mediante el bloqueo específico de las cascadas de inducción de IFN.
3. Inhibición de la señalización por IFN.

4. Bloqueo de la actividad antiviral de las enzimas y proteínas celulares activadas en respuesta a IFN.

5. Desarrollo de estrategias de replicación que sean insensibles a la acción de IFN.

Dentro de cada una de estos tipos, se pueden clasificar la gran diversidad de mecanismos moleculares desarrollados por los diferentes virus, y que en muchos casos tienen el mismo efecto final. Además, para que un virus sea capaz de contrarrestar la respuesta IFN de forma eficaz, normalmente es necesario que use una combinación de dichas estrategias. El virus de la gripe también ha desarrollado mecanismos para evadir o bloquear la respuesta IFN. El resumen de las estrategias y mecanismos más importantes usados por el virus están reflejados en la **Figura In8** y se explican en detalle a continuación.

5.2. La proteína NS1

La proteína NS1 es el principal factor encargado del bloqueo de la respuesta IFN por parte de el virus de la gripe. Se trata de una proteína multifuncional, que además de su papel en contrarrestar esta respuesta, participa en multitud de procesos y etapas de ciclo viral, incluyendo la replicación del RNA viral, la síntesis de proteínas virales, y el control de la fisiología general de la célula infectada. Aunque es un factor no esencial, media muchos de los mecanismos que permiten al virus alterar el metabolismo celular y aprovechar determinadas funciones celulares en su propio beneficio.

5.2.1. Estructura y dominios de la proteína NS1.

NS1 es una proteína no estructural de pequeño tamaño, entre 230-238 aminoácidos según la cepa de virus, y un peso molecular de 26 kDa aproximadamente (Palese, P. & Shaw, 2007). Se expresa a partir del transcrito primario del segmento 8. Se produce desde etapas tempranas de la infección, localizándose principalmente en el núcleo (Briedis *et al.*, 1981b), aunque a tiempos tardíos también se puede encontrar en el citoplasma asociada a polisomas (Falcón *et al.*, 1999; de la Luna *et al.*, 1995).

Se pueden distinguir dos dominios estructurales en la proteína. El extremo N-terminal, entre los aminoácidos 1 y 73, forma el dominio de unión a RNA (Qian *et al.*, 1995), que se encuentra conectado a través de un *linker* al dominio central o dominio efector (residuos 86-204) (Bornholdt & Prasad, 2006). Los últimos 25 aminoácidos no tienen una estructura definida, y componen la cola flexible C-terminal (Hale *et al.*, 2008) (Figura In9A).

El dominio de unión a RNA de forma aislada forma un homodímero simétrico, en el que cada monómero consiste en tres α -hélices (Chien *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Se ha determinado mediante experimentos de mutagénesis que los residuos básicos Arg-38 y Lis-41 son los responsables directos de la unión a RNA, aunque otros residuos cercanos incrementan la estabilidad del complejo o ayudan a la formación del dímero (Wang *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2007) (Figura In9A). La unión de RNA no presenta especificidad de secuencia y se ha descrito la

capacidad de unir RNA de diferentes tipos: rRNA28S, dsRNA, regiones 5' no traducidas (5'UTR) de los mRNAs virales, RNAs con secuencias poli-A, vRNA y cRNA viral, y los U6 snRNA y U6atac snRNA (Garfinkel & Katze, 1993; Hatada & Fukuda, 1992; Hatada *et al.*, 1992, 1997; Lu *et al.*, 1994; Qiu & Krug, 1994; Qiu *et al.*, 1995; Wang & Krug, 1998; Wang *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1981).

El dominio efector también forma un homodímero, y cada monómero consiste en siete láminas- β y tres α -hélices (Bornholdt & Prasad, 2006). La presencia de este dominio se ha relacionado con la capacidad de NS1 para realizar muchas de las funciones que se le atribuyen, y es capaz de interactuar con muchas proteínas tanto virales como celulares (Figura In9A). La cola flexible C-terminal presenta diferentes funciones y longitud variables dependiendo de la cepa.

Recientemente, la determinación de la estructura completa de la proteína ha revelado que ésta es capaz de multimerizar formando una estructura tubular en la cual el RNA quedaría escondido en el interior y una superficie externa, por donde podría interactuar simultáneamente con otros ligandos durante la infección (Bornholdt & Prasad, 2008) (Figura In9B-C).

La proteína NS1 contiene tanto señales de localización nuclear (NLS) como de exportación (NES), lo que explica su localización variable a lo largo de la infección. Además es una proteína que puede sufrir diferentes modificaciones postraduccionales. La fosforilación de NS1 se ha descrito como un fenómeno específico de cepa y se ha propuesto que los residuos Ser-195 y Tre-197 serían claves para la misma, aunque no se conoce bien su relevancia funcional (Bornholdt & Prasad, 2006; Conti *et al.*, 1980; Petri *et al.*, 1982; Privalsky & Penhoet, 1981). Además de esta modificación, se ha descrito la unión de ISG15 al residuo Lis-41 de NS1 como parte de la respuesta IFN de la célula. Esta unión bloquea la capacidad de unir RNA de NS1 (Zhao *et al.*, 2010).

5.2.2. NS1 como modulador de la infección

Aparte de su papel en contrarrestar la respuesta IFN, la proteína NS1 es un factor de regulación clave durante la infección que afecta

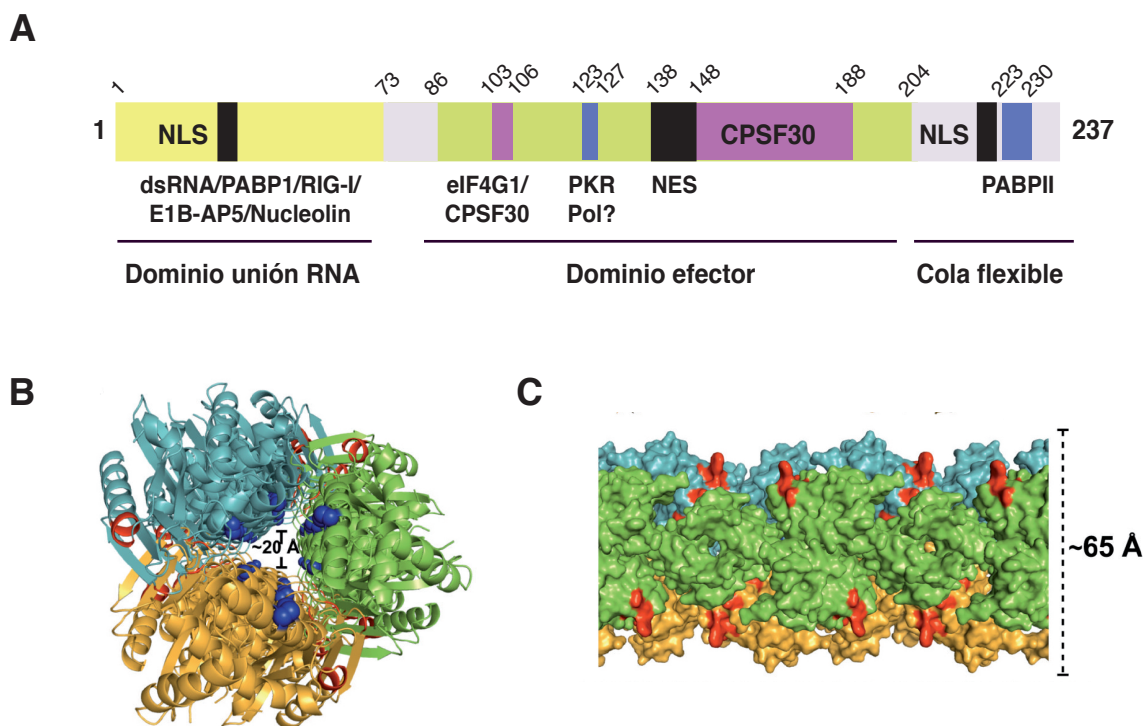


Figura In9.

A) Esquema de la proteína NS1 y sus dominios de interacción. Se muestra el dominio de unión a RNA, el dominio efector y las regiones flexibles. Se indican también los dominios de interacción con diferentes factores celulares (adaptado de Hale *et al.*, 2008). **B y C) Estructura tubular de la proteína NS1.** Estructura tubular de NS1 vista desde el eje axial mostrando el túnel (B) y vista de su superficie (C). Se indican los diámetros del túnel y de la estructura tubular completa. Los residuos 38 y 41, críticos para la unión de RNA se muestran en azul, y los residuos críticos para la unión de CPSF30 en rojo (Bornholdt & Prasad, 2008).

a la expresión génica celular y viral (García-Sastre, 2001; Hale *et al.*, 2008; Krug *et al.*, 2003). A continuación se explican brevemente estas funciones.

- Modulación de la actividad de la polimerasa viral

Durante los procesos de transcripción y replicación viral la actividad de la polimerasa viral está altamente regulada. Esta regulación tiene lugar en parte por factores celulares, aunque existen datos que sugieren la participación activa de NS1. El dominio de unión a RNA de NS1 es capaz de interactuar con el vRNA viral, con la estructura de panhandle y el mRNA (Hatada & Fukuda, 1992; Hatada *et al.*, 1997; Marión *et al.*, 1997b). Por otra parte, se ha demostrado la interacción de NS1 con la polimerasa y/o las RNPs durante la infección (Marión *et al.*, 1997b). También se ha descrito que un mutante de delección de la proteína NS1 (NS1-81) tiene afectada la replicación

de algunos genes virales (Falcón *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que la sustitución de los residuos 123 y 124, además del efecto en la unión a PKR que se explicará más adelante, tienen un efecto en la regulación temporal de la síntesis de vRNA durante la infección (Min *et al.*, 2007). En conjunto estos resultados hacen pensar que NS1 podría estar involucrada en la modulación de la actividad de la polimerasa viral, aunque se desconoce el mecanismo concreto y la relevancia funcional en la infección.

- Modulación del proceso de *splicing*

Como se ha visto antes, en la célula infectada los segmentos víricos 7 y 8 generan las proteínas M1 y NS1 respectivamente a partir del transcrito primario, pero en un reducido porcentaje de los casos, estos transcritos son procesados por la maquinaria de *splicing*, dando lugar a las proteínas M2 y NEP (Smith & Inglis, 1985; Valcárcel *et al.*, 1991). Además el segmento 7 puede ser

procesado de forma alternativa para dar lugar al péptido M3. Se ha descrito que la eficiencia de *splicing* de estos dos transcritos varía a lo largo del ciclo infectivo, lo que podría ser esencial para permitir la aparición de las proteínas M2 y NS2 en etapas tardías (Fortes *et al.*, 1994), y que NS1 tendría un papel clave en este proceso. Se ha observado que la expresión *in trans* de NS1 inhibe el *splicing* de intrones constitutivos, altera la elección del sitio de *splicing* en el caso de intrones alternativos y produce una redistribución intranuclear de los factores de *splicing* (Fortes *et al.*, 1994, 1995). Además, es capaz de inhibir el *splicing* del segmento 8 *in vivo* y *in vitro* (Fortes *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994). Experimentos posteriores en los que NS1 se sintetizó a partir de vRNPs funcionales, confirmaron el papel de NS1 en la inhibición del *splicing* del segmento 8, y que esta función dependía del extremo N-terminal, aunque la función de unión a RNA no era necesaria (Garaigorta & Ortín, 2007). Adicionalmente, se ha descrito que la función de unión a RNA de esta proteína es necesaria para la inhibición de la exportación nuclear de su propio mRNA, lo que podría afectar a la eficiencia de *splicing* del mismo (Alonso-Caplen & Krug, 1991; Alonso-Caplen *et al.*, 1992; Garaigorta & Ortín, 2007). Sin embargo, un trabajo reciente con datos obtenidos a partir de vRNPs funcionales y de infección indicarían que NS1 no tiene ningún efecto en el *splicing* de su propio mRNA (Robb *et al.*, 2010), aunque si en el del segmento 7 (Robb & Fodor, 2012).

- Traducción selectiva de los mRNAs virales

Como se ha comentado anteriormente, durante la infección tiene lugar una traducción selectiva de los mRNAs virales frente a los celulares (Garfinkel & Katze, 1992). Este proceso debe estar muy bien regulado, ya que los mRNAs virales resultan estructuralmente indistinguibles de los celulares. Parece que este proceso está dirigido en gran medida por el extremo 5'UTR de los mRNAs virales, donde existe una secuencia corta que es común a todos los mensajeros del virus, y que determina la selectividad y estimulación traduccional frente a los celulares (Garfinkel & Katze, 1993). Además de estas secuencias *in cis*, se han identificado factores que también están implicados en este proceso. Se ha demostrado que NS1 se localiza en polisomas durante la infección, y que su presencia favorece la incorporación de ribosomas a mRNAs virales

transfectados (De la Luna *et al.*, 1995). También se ha descrito la interacción de NS1 con el extremo 5' de los mRNAs virales (Park & Katze, 1995) y con los factores celulares eIF4G y PABP1 (Aragón *et al.*, 2000; Burgui *et al.*, 2003), lo que permitiría el mecanismo de recirculación de los mRNAs virales y favorecería la reiniciación de la traducción (Yángüez & Nieto, 2011).

- Interacción con diferentes vías de señalización celulares

La infección por el virus de la gripe activa ciertas cascadas de señalización entre las que se encuentra la vía MKK4/7-JNK1 (Kujime *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2001) y la vía de PI3K (Hale *et al.*, 2006).

Mediante experimentos de infección con el virus del NS1, que carece de la proteína NS1, se ha observado que la replicación viral estimula la actividad transcripcional del factor AP-1 y de sus genes diana, mediante la vía MKK4/7-JNK (Ludwig *et al.*, 2001). Además, la expresión de NS1 inhibe la activación de la cascada JNK y la fosforilación del factor c-Jun (Ludwig *et al.*, 2002). Se ha relacionado la activación de esta vía con la inducción de apoptosis, y aunque no se conoce bien la acción de NS1, parece que esta inhibición evitaría la entrada en apoptosis de la célula infectada (Kujime *et al.*, 2000; Schultz-Cherry *et al.*, 1998, 2001).

Por otro lado, se ha descrito la interacción de NS1 con la subunidad reguladora de PI3K, p85 β , durante la infección. Esta unión estaría mediada por el residuo 89 de NS1 (Hale *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2007). Adicionalmente, tanto la infección como la expresión de forma aislada de la proteína NS1 inducen la fosforilación del factor Akt. Esta fosforilación depende estrictamente de la actividad de PI3K aunque no está mediada directamente por ésta. Sin embargo, el virus del NS1 no induce la fosforilación de Akt (Ehrhardt *et al.*, 2007), ni tampoco un virus PR8 mutante de NS1 en los residuos Pro-164 y Pro-167 (Shin *et al.*, 2007). Todos estos datos sugieren que NS1 participa en la activación de la vía de señalización PI3K-Akt. Esta vía tiene un papel importante en varios procesos celulares, entre los que cabe destacar su papel anti-apoptótico, en proliferación, crecimiento celular, y producción y señalización mediada por citoquinas. Varios estudios indican que la

activación de esta vía por NS1 mediaría una respuesta anti-apoptótica evitando que la célula infectada entrara en apoptosis (Ehrhardt *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007), aunque existen estudios contradictorios.

5.2.3. NS1 como antagonista del sistema interferón

A pesar de las múltiples acciones de NS1 que se han explicado anteriormente, una de las funciones principales y con mayor peso en el ciclo del virus es el bloqueo y evasión de la respuesta IFN. La generación de virus que carecen de la proteína NS1 (virus delNS1) o mutantes que expresan formas trucadas de la proteína, han revelado que NS1 tiene un papel crucial en contrarrestar esta respuesta (Egorov *et al.*, 1998; García-Sastre *et al.*, 1998; Kochs *et al.*, 2007a). El virus delNS1 induce grandes cantidades de IFN en comparación con un virus silvestre. Estos resultados correlacionan con el hecho de que este virus sea atenuado en células competentes para el sistema IFN, pero sin embargo replique más eficientemente en células deficientes en esta respuesta, como Vero o NIH 3T3 PKR^{-/-} (García-Sastre *et al.*, 1998). Además los estudios realizados con este virus y con virus con deleciones en NS1 han mostrado una correlación entre la síntesis de mRNA de IFN- β y su atenuación *in vivo* (Bergmann *et al.*, 2000; Solórzano *et al.*, 2005). Esta correlación también se ha observado en experimentos en los que se han comparado diferentes cepas del virus (Cauthen *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2007).

La proteína NS1 es capaz de contrarrestar la respuesta IFN a varios niveles (**Figura In8**). Los mecanismos y dianas que utiliza son muy amplios y variados, siendo muchas veces específicos de cepa (Hayman *et al.*, 2007; Kochs *et al.*, 2007b; Twu *et al.*, 2007). A continuación se detallan estos mecanismos siguiendo la clasificación anterior sobre las estrategias de bloqueo usadas por los diferentes virus (**apartado 5.1**).

- Bloqueo de la expresión de genes celulares y/o la síntesis de proteínas

NS1 es capaz de inhibir el procesamiento del extremo 3' de los pre-mRNAs celulares. Para que los mensajeros celulares maduren y puedan ser transportados correctamente al citoplasma para ser traducidos, necesitan sufrir una serie de modificaciones que consisten en el corte y

la posterior poliadenilación del RNA. El factor celular CPSF desempeña un papel fundamental en este proceso. Se ha demostrado la interacción de NS1 con la subunidad de 30kDa de este factor (CPSF30) tanto *in vitro* como en infección, confirmándose que esta unión inhibe el corte y poliadenilación de los pre-mRNAs *in vitro* e *in vivo* (Nemeroff *et al.*, 1998). La estructura de NS1 unida a RNA y a CPSF30 ha sido resuelta, lo que, junto a experimentos de mutagénesis, ha permitido conocer que los residuos Phe-103; Met-106, Leu-144 y los residuos 184-188 son necesarios para esta unión (Das *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2001; Noah *et al.*, 2003; Twu *et al.*, 2006, 2007). Además, NS1 es capaz de interaccionar e inhibir el factor celular PABPII (Chen *et al.*, 1999) y parece que esta unión está mediada por los residuos 223-237 (Li *et al.*, 2001). Los mRNAs virales no sufren esta inhibición ya que la poliadenilación de los mismos sigue un mecanismo diferente (Poon *et al.*, 1998, 1999).

NS1 también inhibe el transporte de los mRNAs poliadenilados. Se ha sugerido que NS1 puede formar un complejo con los componentes de la maquinaria de exportación nuclear de los mRNAs celulares, inhibiendo su función. Concretamente se ha descrito la interacción con los factores NXF1, p15, Rael, E1B-AP5 y Nup98 (Satterly *et al.*, 2007).

Además de estos procesos, tal y como se ha explicado antes, NS1 es capaz de inhibir el *splicing* de los mensajeros celulares (Fortes *et al.*, 1994, 1995; Qiu *et al.*, 1995). Conjuntamente, estos tres efectos contribuyen a la regulación de la expresión génica celular, impidiendo que esta tenga lugar de una forma normal en las células infectadas. Estos mecanismos suponen un claro beneficio para el virus, al permitir el secuestro de la maquinaria celular para su propio beneficio. Pero además evitan la expresión de IFN y de los genes ISGs, lo que tiene una importancia crucial en el bloqueo de la respuesta IFN por parte del virus.

- Disminución de la producción de IFN al limitar la generación de PAMPs y/o mediante el bloqueo específico de las cascadas de inducción de IFN

Como se ha indicado anteriormente, NS1 es capaz de unir dsRNA y RNA de varios tipos. Esta unión evita que éste sea reconocido por

los diferentes sensores celulares como RIG-I, o por las enzimas PKR o OAS. De esta forma NS1 bloquea el inicio de la cascada, al competir con las proteínas celulares por la unión a los PAMPs. La afinidad de NS1 por el RNA es inferior a la de estas proteínas, pero la estructura multimérica de NS1 permite una unión cooperativa que aumenta la avidéz y que dependería de la longitud de la estructura tubular (Bornholdt & Prasad, 2008).

Varios estudios indican que la proteína NS1 de la cepa PR8 podría formar un complejo con RIG-I (Opitz *et al.*, 2007; Pichlmair *et al.*, 2006), aunque la unión directa de NS1 y RIG-I todavía no ha sido demostrada (Mibayashi *et al.*, 2007). Además, experimentos adicionales indican que la proteína NS1 de esta cepa es capaz de bloquear la función de MAVS, y de un mutante de RIG-I constitutivamente activo al que se le ha eliminado el dominio de unión a RNA (Mibayashi *et al.*, 2007). Estos datos indicarían que la proteína NS1 de PR8 podría inhibir la cascada de señalización de RIG-I/MAVS, aunque el mecanismo molecular todavía no ha sido establecido.

Por otro lado, NS1 es capaz de unir e inhibir la actividad de la enzima TRIM25, que como se ha comentado anteriormente, es clave para la óptima activación de RIG-I y la subsiguiente inducción de IFN. Un virus recombinante que expresa la proteína NS1 mutante E96A/E97A muestra defectos en este bloqueo y es menos virulento en ratón (Gack *et al.*, 2009).

En su conjunto, estos mecanismos impiden el reconocimiento de PAMPs por parte de la célula y la transmisión de la señal, evitando así la expresión de IFN.

- Inhibición de la señalización por IFN

Experimentos de expresión de la proteína NS1 del virus H5N1 muestran una reducción de la fosforilación de las proteínas STAT inducida por IFN. Consecuentemente, también se observó una menor unión de las proteínas STATs a DNA. En este estudio se atribuyó este efecto de NS1 a una restricción en la expresión del receptor de IFN. En el mismo artículo también se describe un aumento de la expresión de las proteínas SOC1 y SOC3. La actividad de estas proteínas inhibe la señalización por IFN mediante la desfosforilación de STAT (Jia *et al.*, 2010). Este aumento de expresión también ha sido observado por otros grupos en experimentos de infección con otras

cepas del virus (Pauli *et al.*, 2008; Pothlichet *et al.*, 2008), aunque no está claro el mecanismo responsable.

- Bloqueo de la actividad antiviral de las enzimas y proteínas celulares activadas en respuesta a IFN

NS1 puede bloquear directamente la función de dos de las principales proteínas con actividad antiviral, PKR y OAS. Como se ha visto anteriormente, ambas enzimas tienen un papel clave en la regulación de los procesos de transcripción y traducción del virus, pero además desempeñan otras funciones importantes en la inducción de INF- β y en la respuesta apoptótica de la célula. Al igual que ocurre en la inhibición de RIG-I, NS1 es capaz de unir RNA viral compitiendo así por el reconocimiento de éste por ambas enzimas, y por tanto inhibiendo la activación de las mismas (Hatada *et al.*, 1999; Min & Krug, 2006). Pero además de este bloqueo general, NS1 es capaz de inhibir PKR mediante mecanismos adicionales. Estudios realizados con un mutante NS1 de unión a RNA indican que en estas condiciones sigue existiendo una inhibición de la activación de PKR (Li *et al.*, 2006). En ese sentido, se ha descrito que NS1 interacciona con PKR, y que los residuos 123-127 son necesarios para esta unión (Li *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2007; Tan & Katze, 1998). Se ha propuesto que NS1 interaccionaría con el dominio *linker* de PKR impidiendo el cambio conformacional que se requiere para su activación (Li *et al.*, 2006). Además experimentos *in vitro* sugieren que podría existir una interacción de NS1 con el factor PACT, que como se explicó anteriormente es necesario para la activación de PKR (Li *et al.*, 2006). Los autores de este trabajo proponen que NS1 podría inhibir la activación de PKR no sólo por dsRNA sino también por PACT. Por otro lado, otro trabajo sugiere que la inducción del factor inhibidor de PKR, P58(IK), que ocurre durante la infección sería el responsable de que PKR se mantenga inhibido (Lee *et al.*, 1994; Melville *et al.*, 1999). En experimentos de infección de ratones PKR^{+/+} con el virus del NS1 este virus muestran un alto grado de atenuación, mientras que en la infección de ratones PKR^{-/-} este virus se comporta de forma muy similar al virus paterno PR8, que sí expresa la proteína NS1 (Bergmann *et al.*, 2000). Parece claro, que independientemente del mecanismo, el virus es capaz de inhibir la activación de PKR, lo que resulta clave para mantener la síntesis de

proteínas virales durante la infección, y NS1 está implicada en este proceso.

5.3. Otras proteínas virales

A pesar de que NS1 es el principal antagonista de la cascada IFN, en los últimos años se han descrito que otras proteínas virales podrían tener algún papel en modular esta respuesta (Figura In8).

Se ha relacionado a la proteína PB1-F2 con la virulencia y patogénesis del virus. El polimorfismo N66S, encontrado en la cepa humana pandémica de la gripe de 1918, se ha asociado con un aumento de la patogénesis (Conenello *et al.*, 2007; McAuley *et al.*, 2007, 2010; Schmolke *et al.*, 2011). Esta proteína presenta una señal de localización mitocondrial y se ha descrito que podría interactuar con MAVS en la mitocondria e inhibir la expresión de IFN (Dudek *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011). Por otro lado, existen estudios contradictorios con la cepa WSN en células epiteliales que indican que la expresión de PB1-F2 aumenta la expresión de INF- β . Este efecto podría estar controlado por la secuencia de la proteína, y existir diferencias significativas entre diferentes cepas de virus (Le Goffic *et al.*, 2010).

Se ha descrito que la subunidad de la polimerasa PB2 se localiza en la mitocondria además de en el núcleo (Carr *et al.*, 2006). Esta proteína inhibe también la actividad de MAVS (Graef *et al.*, 2010; Iwai *et al.*, 2010). Previamente, en estudios de inactivación del virus por UV (Marcus *et al.*, 2005) y análisis de interacción entre proteínas virales y celulares (Shapira *et al.*, 2009), se había sugerido que la polimerasa del virus podría tener un papel en el control de la respuesta IFN. Hay que tener también en cuenta, que la actividad de *cap snatching* de la polimerasa del virus, que permite la generación de estructuras cap a partir de mRNAs celulares, podría contribuir también al bloqueo de la respuesta IFN mediante la inhibición general de la expresión de genes celulares, entre los que se encuentran los mRNAs de IFN e ISGs (Schmolke & García-Sastre, 2010). Por otro lado, las cepas de virus con polimerasas altamente eficientes pueden adelantarse a la respuesta IFN *in vivo* gracias a su alta velocidad de replicación (Grimm *et al.*, 2007).

La proteína NP interacciona con el factor celular Hsp40 (Sharma *et al.*, 2011). Este factor interacciona con el inhibidor P58(IPK) (Melville *et al.*, 1999), y se ha descrito que la interacción de éste con NP provocaría la disociación de esta unión. Como se ha indicado anteriormente, la liberación de P58 permite la inhibición de PKR, por un mecanismo adicional al de NS1

6. SALTOS DE HUÉSPED, ADAPTACIÓN Y VIRULENCIA

A pesar de todos los mecanismos que ha generado el virus de la gripe para evadir la respuesta IFN, ésta sigue teniendo un papel crítico para impedir infecciones graves provocadas por el virus. Estudios de infección en ratones indican que en ausencia de IFN se produce un incremento de la replicación viral y aumenta la patogenicidad de las infecciones (Mordstein *et al.*, 2008). Como se ha visto anteriormente, muchos de los mecanismos desarrollados por el virus para contrarrestar esta respuesta dependen directamente de la interacción con proteínas y factores celulares. Este hecho hace pensar que probablemente estas interacciones tienen un papel importante en el tropismo, y que pueden existir diferencias entre cepas que restrinjan el rango de hospedador e impidan la transmisión entre especies. Este tipo de fallos en evadir la respuesta IFN en un determinada especie o huésped puede ser como resultado de 1) el antagonista del virus no funciona correctamente en ese nuevo hospedador, 2) el ciclo de replicación viral es demasiado lento, permitiendo a la célula responder antes de que el virus produzca suficientes proteínas para evadir la respuesta, o 3) la producción de diferentes PAMPs o aumento en la cantidad por parte del virus debido a los cambios en los procesos de replicación y transcripción en el nuevo hospedador.

Recientemente se ha publicado un análisis de la sensibilidad de un amplio abanico de cepas del virus de la gripe a las proteínas Mx murina (Mx1) y humana (MxA) (Dittmann *et al.*, 2008). Los resultados muestran que las cepas de origen aviar son altamente sensibles a Mx1, mientras que las cepas de origen humano presentan una respuesta mucho más débil. Experimentos de intercambio de genes virales (*reassortment*)

en un sistema de minireplicon identificaron que NP era el principal factor responsable de la sensibilidad a MxA. Estos datos concuerdan con los datos mencionados anteriormente que indican que NP es la diana de la actividad antiviral de MxA (Daumke *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010). Es de destacar que en estos experimentos, la cepa de 1918 H1N1, “la gripe española”, resultó ser mucho menos sensible a la proteína humana MxA que la cepa aviar altamente patógena H5N1 (A/ Vietnam/1203/04). Estos resultados sugieren que las proteínas Mx conforman una barrera que dificulta el salto de hospedador de aves a humanos. Esta hipótesis se ve reforzada por los datos de infección de ratones con varios virus recombinantes que expresaban la proteína NP procedente de cepas aviares o humanas intercambiada, y que indican que el origen de la proteína NP determina la sensibilidad a Mx (Zimmermann *et al.*, 2011). Estos resultados hacen pensar que los virus humanos han adquirido mutaciones adaptativas que les permiten evadir la restricción que supone MxA. Complementariamente, explicarían los elevados niveles de citoquinas y quimoquinas, así como la exacerbada respuesta que producen las cepas H5N1 altamente patógenas en humanos (revisado por Ramos & Fernandez-Sesma, 2012).

Otro elemento del virus de la gripe con una función en la evasión de la respuesta antiviral es el complejo de la polimerasa. La subunidad PB2, con una lisina en la posición 627, es predominante en virus humanos, mientras que un glutámico en esta posición es típico de cepas aviares. Este residuo se considera también como un determinante de virulencia, ya que los virus con una lisina son más virulentos y patógenos en ratones. Estos virus producen una mayor cantidad de citoquinas, como TNF- α , INF- β y IP-10. Recientemente se ha descrito que la NLS de PB2 interacciona con el factor celular importina- α , implicado en el transporte de proteínas núcleo-citoplasma. Diferentes experimentos indican que esta unión no es sólo necesaria para el transporte, sino que también tendría un papel en la replicación viral (Resa-Infante *et al.*, 2008). Existen diferentes isoformas de importina- α en cada especie, y al contrario de lo que ocurre con Mx, se ha descrito que para permitir el salto de hospedador el virus necesita adaptarse, permitiendo la unión a las importinas presentes en el nuevo huésped (Gabriel *et al.*, 2008, 2011).

Tal y como se ha visto antes, la proteína NS1 también tiene una gran importancia en la adaptación y la virulencia de gripe. Muchas de las funciones en el bloqueo de la respuesta IFN que se han indicado antes son en muchos casos específicos de cepa. Se ha descrito que un virus H7N7 aviar que codifica una proteína NS1 con una delección larga en el extremo C-terminal, o que ha perdido la proteína completa, es atenuado en ratones, e induce una fuerte respuesta IFN tanto en células de mamíferos como aviares. Consecuentemente, estos virus son altamente patógenos en ratones MxA^{-/-} (Kochs *et al.*, 2007b). Resultados similares se han obtenido con virus de cerdo que también expresan proteínas trucadas en el extremo C-terminal (Solórzano *et al.*, 2005), resultados que se confirman en virus de pavo (Cauthen *et al.*, 2007). Recientemente, se ha descrito que la interacción de NS1 con TRIM25 también podría ser específica de especie (Rajsbaum *et al.*, 2012). Como se ha comentado anteriormente, esta unión inhibe la ubiquitinación de RIG-I por parte de TRIM25. Se ha observado que las diferentes proteínas NS1 de cepas aviares, humanas y de cerdo difieren en su capacidad de unión a las proteínas TRIM25 de distintas especies.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El sistema interferón es la primera línea de defensa de la célula contra los patógenos. Cuando un virus infecta una célula se desencadena una respuesta que finaliza con la expresión de determinados genes. De esta forma se genera un estado antiviral tanto en la célula infectada como en las células vecinas que impide la replicación y propagación del virus. La mayoría de los virus han desarrollado estrategias para evadir o bloquear esta respuesta. En el caso del virus de la gripe, es la proteína NS1 la que desempeña un papel clave en este proceso. NS1 es capaz de bloquear esta respuesta a varios niveles, impidiendo a la célula responder ante la presencia del virus y permitiendo por tanto la replicación viral. En los últimos años, además de NS1, se ha sugerido que otros genes virales podrían tener un efecto en modular esta respuesta.

En este proyecto se pretende obtener una imagen general de los mecanismos desarrollados por el virus de la gripe para bloquear la respuesta IFN, mediante la generación de una colección de mutantes virales que tengan afectado el bloqueo de la misma.

Para ello se han seguido dos estrategias:

- 1) Mutagénesis al azar del segmento NS.
- 2) Realización de pases consecutivos de un virus silvestre sobre células con el sistema IFN interrumpido.

Ambas estrategias son complementarias y se centran en aspectos diferentes. En la primera se pretende entender mejor el papel de NS1 en el bloqueo de esta respuesta y en la segunda se pretende establecer si hay otros genes del virus implicados en este bloqueo.

Con estos antecedentes, el Objetivo general de esta Tesis es el estudio de los mecanismos desarrollados por el virus de la gripe para contrarrestar y evadir la respuesta mediada por interferón. En este contexto, nos propusimos los siguientes Objetivos concretos:

1. Estudiar la implicación de la proteína NS1 en el bloqueo de la respuesta IFN.
2. Analizar si hay otros genes virales implicados en el bloqueo de la respuesta IFN y la importancia de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES BIOLÓGICOS

1. LÍNEAS CELULARES

- **MDCK:** células embrionarias de riñón de perro (Madin & Darby, 1958). Cedidas por T. Zürcher y obtenidas de la ATCC.

- **MDCK-V2:** células MDCK que constitutivamente expresan la proteína V del virus Parainfluenza de tipo II (PIV2) (Precious *et al.*, 2005). Cedidas por R. Randall (St. Andrews University, St. Andrews, Scotland).

- **MDCK-V5:** células MDCK que constitutivamente expresan la proteína V del virus Parainfluenza de tipo V (PIV5) (Precious *et al.*, 2005). Cedidas por R. Randall (St. Andrews University, St. Andrews, Scotland).

- **A549:** células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard *et al.*, 1973). Cedidas por J.A. Melero (Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid).

- **A549/pr(INF- β).GFP:** células A549 que expresan GFP bajo el promotor de IFN- β (Chen *et al.*, 2010; Killip *et al.*, 2011). Cedidas por R. Randall (St. Andrews University, St. Andrews, Scotland).

- **A549/BVDV-N^{pro}:** células A549 que constitutivamente expresan la proteína N^{pro} del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) (Hilton *et al.*, 2006). Cedidas por R. Randall (St. Andrews University, St. Andrews, Scotland).

- **A549/pr(ISRE).Luc:** células A549 que expresan luciferasa bajo el promotor ISRE. Cedidas por G. Adolf (Boehringer Ingelheim, Austria).

- **A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N^{pro}:** células A549/pr(ISRE).Luc que expresan la proteína N^{pro} del virus BVDV (Hilton *et al.*, 2006). Cedidas por R. Randall (St. Andrews University, St. Andrews, Scotland).

- **HEK293T:** células embrionarias de riñón humano (Graham *et al.*, 1977). Cedidas por J.C. de la Torre (The Scripps Research Institute, LaJolla, USA).

2. ESTIRPES BACTERIANAS

- **E.Coli DH5 α :** cepa bacteriana utilizada para la amplificación de plásmidos.

3. VIRUS

- **A/Victoria/3/75 (H3N2) (Vic):** cepa de gripe humana de campo. Obtenida del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (Madrid).

- **A/PR/8/34 (H1N1) (PR8):** cepa vacunal de gripe humana. Cedida por A. García Sastre (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA).

- **A/PR/8/34 Δ NS1 (H1N1) (delNS1):** cepa derivada de la anterior con una delección que impide la expresión de la proteína NS1 (García-Sastre *et al.*, 1998). Cedida por A. García Sastre (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA).

- **Virus de la Miocarditis Encefálica (EMCV):** Virus de la familia de los picornavirus. Cedido por R. Randall (St. Andrews University, St. Andrews, Scotland).

- **Virus recombinantes Victoria A/Vic-I115M(M1),-D30N(M1),-A86S(M2),-D30N(M1)/A86S(M2), -I64T (NS1), -I68T(NS1), -E172K (NS1) y -I68T/E172K (NS1).** Virus recombinantes derivados de la cepa de campo A/Victoria/3/75 generados durante esta Tesis y cuya construcción se describe más adelante.

4. PLÁSMIDOS

- **pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPA y pCMVNP:** plásmidos que codifican los cDNAs de cada una de las tres subunidades de la polimerasa o de la proteína NP de la cepa A/Victoria/3/75 bajo el promotor de citomegalovirus. Construidos y cedidos por J. Ortega (Falcón *et al.*, 2004).

- **pCMVPB2HIS:** plásmido que codifica el cDNA de la subunidad de la polimerasa PB2 fusionada a una etiqueta de polihistidina para permitir su purificación. Fue clonado y cedido por R. Coloma (Guilligay *et al.*, 2008).

- **PHH21 y derivados:** plásmido cedido por G. Hobom. Los plásmidos derivados de éste expresan

los distintos vRNAs de los segmentos de la cepa Vic bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Construidos por A Falcón y Y. Fernández (Falcón *et al.*, 2004).

- **Genoteca pHHNS:** genoteca mutante derivada del plásmido pHHNS obtenida a lo largo de esta Tesis y cuya construcción se describe más adelante.

- **pHHMI115M(M1), pHHMD30N(M1), pHHMA86S(M2), pHHMD30N(M1)/A86S(M2), pHHNSI64T, pHHNSI68T, pHHNSE172K y pHHNSI68T/E172K:** plásmidos derivados del pHHM y pHHNS obtenidos a lo largo de esta Tesis y cuya construcción se describe más adelante.

5. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- **NS1 5395:** suero policlonal de conejo generado frente a la proteína recombinante His-NS1 purificada a partir de bacteria (Marión *et al.*, 1997).

- **NS1 rata 1:** suero policlonal de rata generado frente a la proteína recombinante His-NS1 purificada a partir de bacteria (Garaigorta *et al.*, 2005).

- **NP:** suero policlonal de conejo generado frente a la proteína recombinante His-NP purificada a partir de bacteria. Generado y cedido por N. Zamarreño (Resa-Infante *et al.*, 2008).

- **M1-M2:** anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente a un epítipo amino-terminal común para las proteínas M1 y M2. Fue cedido por A. García Sastre (Salvatore *et al.*, 2002).

- **X31:** suero policlonal de oveja dirigido frente al virus purificado X31 (H3N2). Fue adquirido a Diagnostics Scotland (Hale *et al.*, 2010).

- **β -actina:** anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la subunidad beta de la actina (ab8226). Fue adquirido a Abcam.

- **p-IRF3 (ser396) (4D4G):** anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce la forma

fosforilada de la serina 396 de IRF3. Fue adquirido a Cell Signaling (#4947).

- **Mx1/2/3:** anticuerpo policlonal de conejo que reconoce las diferentes isoformas de la proteína Mx. Fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology (sc-50509).

- **ISG56/IFIT1(N-16):** anticuerpo policlonal de cabra contra el extremo N-terminal de ISG56/IFIT1. Fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology (sc-82946).

- **p-Akt (ser473):** anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la forma fosforilada en la serina 473 de Akt. Fue adquirido a Cell Signaling (#5102).

- **Akt (pan):** anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce el extremo C-terminal de las 3 isoformas de Akt (Akt1/2/3). Fue adquirido a Cell Signaling (#4691).

- **Stat1:** anticuerpo policlonal de conejo que reconoce STAT1. Fue adquirido a Cell Signaling (#9172).

- **p-eIF2 α (ser52):** anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la forma fosforilada en la serina 52 del factor eIF2 α . Fue adquirido a Invitrogen (44728G).

- **c-caspasa3:** Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la forma procesada de caspasa-3. Fue adquirido a Cell Signaling (#9661).

Los anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot (WB) se obtuvieron de Sigma y fueron:

- cabra anti ratón unido a peroxidasa de rábano.
- cabra anti conejo unido a peroxidasa de rábano.
- ratón anti cabra unido a peroxidasa de rábano.

Los anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia se obtuvieron de Invitrogen y fueron:

- cabra anti rata unido al fluoróforo Alexa 488.
- cabra anti conejo unido al fluoróforo Alexa 594.

6. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados durante esta Tesis se encuentran reflejados en el **Anexo 1**.

MÉTODOS

1. MANIPULACIÓN DE DNA Y CLONAJES

1.1. Construcción por mutagénesis al azar de una genoteca de plásmidos mutantes del segmento NS

Para obtener la genoteca de mutantes al azar en el segmento NS se realizó una PCR sobre el plásmido pHHNS en la que se añadieron análogos de nucleótidos en concentraciones optimizadas para introducir entre 4 y 5 cambios de nucleótido por molécula (19,4 μ M dPTP y 1,5 μ M 8-oxo-dGTP). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C durante 10 ciclos, seguidos de un paso de extensión final de 7 minutos a 72°C. Posteriormente se realizó una segunda PCR de 30 ciclos en las mismas condiciones, usando como molde el producto de la primera y eliminando los análogos de nucleótidos, para permitir así la fijación de las mutaciones en la secuencia.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la primera PCR contenían las secuencias 5' y 3' del segmento NS (5' TERM NS (+) y 3' TERM NS (-) reflejados en el **Anexo 1**). En la segunda PCR los oligonucleótidos contenían además la secuencia de la diana de restricción BsmB1 (BSMBNS-5V y BSMBNS-3V reflejados en el **Anexo 1**). El producto de PCR se digirió con BsmB1 y se clonó en el vector pHH21 utilizando la diana BsmB1.

1.2. Construcción de los plásmidos con mutaciones puntuales en el plásmido pHH para el rescate de virus

Con la finalidad de poder rescatar virus que incluyan las mutaciones descritas en esta Tesis, se generó un conjunto de plásmidos que incorporan dichas mutaciones, a partir de los plásmidos originales pHHNS y pHHM. Para ellos

se utilizó el kit comercial de mutagénesis dirigida *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene (#210514) según las indicaciones del fabricante. Para las PCR se usaron los oligonucleótidos reflejados en el **Anexo 1**. Una vez generados los plásmidos se secuenciaron con los oligonucleótidos pHH directo y pHH reverso para confirmar la presencia de las mutaciones introducidas.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Mantenimiento celular

Todas las líneas celulares utilizadas en esta Tesis se cultivaron en medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales, HEPES 20mm y suero fetal bovino (FBS) al 10%. En los tipos celulares descritos en la **Tabla M1** se suplementó el medio con los diferentes agentes de selección indicados a las concentraciones descritas, con la intención de mantener la expresión de las proteínas recombinantes. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37° y con 5% CO₂.

Tabla M1. Relación de agentes de selección utilizados en el mantenimiento de las líneas celulares

Células	Droga	Concentración de uso
MDCK-V2	Geneticina	200 μ g/ml
MDCK-V5	Geneticina	200 μ g/ml
A549/-BVDV Npro	Puromicina	10 μ g/ml
A549/pr(ISRE).Luc	Blasticidina	5 μ g/ml
A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N ^{pro}	Puromicina Blasticidina	10 μ g/ml 5 μ g/ml

2.2. Infecciones

Las infecciones de células con los diferentes virus, tanto silvestres como mutantes, se realizaron a una multiplicidad de infección (mdí) de 5 unidades formadoras de placa por célula (ufp/célula) (alta multiplicidad) o 10⁻³ (ufp/célula) (baja multiplicidad), según se especifique en cada experimento, excepto en los casos indicados. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células a una confluencia aproximada del 100% subcultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en tampón PBS completo (PBSc) suplementado con 5 μ g/ml de seroalbúmina bovina (BSA). Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Después de 1 hora de adsorción a temperatura ambiente (TA), se retiró el inóculo y se incubaron

las células a 37°C con medio DMEM libre de suero durante el tiempo indicado en cada experimento. En los experimentos a baja multiplicidad de infección se suplementó el medio con 2,5µg/ml de tripsina.

2.3. Transfecciones

2.3.1. Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293T según el protocolo descrito (Graham *et al.*, 1977; Wigler *et al.*, 1979).

2.3.2. Liposomas catiónicos

La cotransfección de RNPs para la purificación de virus se realizó con una mezcla de RNPs purificadas y liposomas catiónicos (Rose *et al.*, 1991).

2.4. Centros infectivos

Las células HEK293T que habían sido previamente transfectadas, se despegaron de la placa con un suave tratamiento con EDTA-tripsina. Estas células se mezclaron en suspensión en una proporción 1:10 con células MDCK-V2 y se sembraron de nuevo en placas de cultivo con medio DMEM-10%FBS. Tras 6h de incubación a 37°C, se retiró el medio, se realizó un suave lavado con DMEM sin suero y se añadió medio DMEM nuevo sin suero suplementado con tripsina (2,5µg/ml).

3. Técnicas virológicas

3.1. Generación de lotes virales

Se infectaron monocapas de células MDCK o de células MDCK-V2 en el caso de los virus mutantes, a baja mdi (10^{-4} o 10^{-5} ufp/célula). Tras 36-48 horas de incubación a 37°C y cuando el efecto citopático observado fue total, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares, se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 2500 rpm para retirar desechos celulares y se guardaron congelados a -80°C.

3.2. Pases seriados

Se partió de un lote de virus Victoria silvestre que previamente se había pasado consecutivamente a una dilución limitante (10^{-5} ufp/célula). Con dicho virus se infectaron monocapas de células MDCK o MDCK-V2 a baja mdi. En total se inocularon 1000 ufp por placa. Este procedimiento se realizó de forma paralela en 6 tandas independientes. Cuando se observó un efecto citopático completo, se recogieron los sobrenadantes, se clarificaron y se usaron para una subsecuente infección en las mismas condiciones que la anterior y usando la misma dilución de virus. Los títulos virales en cada pase se mantuvieron en un rango entre $5 \cdot 10^7$ y $2 \cdot 10^8$ ufp/ml. La **Figura R14** en el **apartado** de Resultados muestra el esquema de infecciones llevadas a cabo.

3.3. Titulación de virus mediante ensayo de placa

Se infectaron monocapas de células MDCK o MDCK-V2 con diluciones decimales seriadas de virus, preparadas en tampón PBSc suplementado con 5µg/ml de BSA. Los cultivos se incubaron 72h a 37°C en un medio semisólido que contenía DMEM, 0,7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2,5µg/ml de tripsina. Cuando las placas del virus resultaron visibles, se fijaron las células con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta (0,1% cristal violeta, 20% metanol) y se hizo un recuento de las placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO} = (\text{Nº de placas}) \times (1/\text{Factor dilución}) \times (1/\text{volumen de inóculo vírico})$$

3.4. Aislamiento de virus a partir de placa

Se realizó un ensayo de placa y se seleccionó la dilución en la que las placas de virus estuvieran lo suficiente separadas entre sí para evitar contaminaciones cruzadas. Se utilizaron pipetas Pasteur de cristal con filtro para picar los clones aislados. Cada clon se resuspendió en 500ml de PBSc suplementado con 5µg/ml de BSA. Dicha dilución se usó para extraer RNA viral y para inocular una nueva monocapa de células MDCK o MDCK-V2 con la intención de generar un lote de virus a partir de un único clon.

3.5. Curvas de crecimiento

Se infectaron monocapas de células MDCK, MDCK-V2, MDCK-V5 o A549 a la multiplicidad especificada en cada experimento y se recogieron porciones del sobrenadante a distintos tiempos post-infección. Posteriormente se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes realizando las correspondientes titulaciones tal y como se indica en el **apartado 3.3** de Materiales y Métodos.

3.6. Purificación de viriones

Los sobrenadantes de células infectadas se clarificaron centrifugándolos 10 minutos a 4°C y 10.000 rpm. Posteriormente, fueron sedimentados a través de un gradiente de capas de sacarosa del 33% y del 50% en TNE (100mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tri-HCl pH 7,5) durante una hora a 4°C y 40.000 rpm en el rotor SW41. Se recogió la interfase del 33% al 50% y se diluyó en TNE. Posteriormente se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 33% en TNE durante 45 minutos a 4°C y 40.000 rpm en el rotor SW55Ti. El sedimento se resuspendió en diferentes tampones según cual fuera a ser su uso posterior.

En los casos en los que los volúmenes de virus eran muy grandes se realizó un paso previo de sedimentación de los sobrenadantes a través de un colchón de sacarosa del 33% en TNE durante 2 horas y media a 4°C y 25.000 rpm en un rotor SW28. El sedimento se resuspendió en TNE para continuar con los pasos descritos anteriormente.

3.7. Purificación de RNPs de viriones

Se partió de un precipitado de viriones purificados generado como se describe en el **apartado 3.6** de Materiales y Métodos.

Sobre dicho precipitado se añadió tampón de lisis (100mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% NP40) suplementado con 3mM DTT y 10mg/ml de lisolecitina, y se cizalló la mezcla con una jeringa de 0,5mm de diámetro hasta conseguir una solución homogénea. El homogenizado resultante fue incubado en agitación durante 45 minutos a 30°C y se centrifugó a continuación durante 30 segundos a 13.000 rpm. El sobrenadante obtenido se purificó

a través de un gradiente discontinuo de 5ml de glicerol (1,2ml de 33%, 0,375ml de 40%, 0,75ml de 50% y 0,75ml de 70% glicerol en 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.8). El gradiente se centrifugó durante 4 horas a 4°C y 45.000 rpm en un rotor SW55Ti. Se recogieron fracciones de 200ml y se localizaron aquellas que contenían RNPs mediante su actividad transcripcional *in vitro* y mediante detección de las proteínas virales, tal y como se describe en los **apartados 4.3 y 6.2** de Materiales y Métodos, respectivamente.

3.8. Rescate de mutantes puntuales

Se utilizó el protocolo descrito (Neumann *et al.*, 1999) pero adaptado y modificado para rescatar la cepa A/Victoria/3/75. Brevemente, se cotransfectaron células HEK293T con los plásmidos genómicos pHH que contienen los cDNAs de los segmentos PB1, PB2, PA, NP, HA, NA, M y NS del virus Victoria. Por la actuación de la RNA polimerasa I celular estos plásmidos dan lugar a los ocho segmentos virales. Además, se cotransfectaron los plásmidos pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA y pCMV-NP que dan lugar a la expresión de las tres subunidades de la polimerasa viral y NP. Según el mutante deseado se cambió el plásmido pHHM o pHHNS por el plásmido mutante correspondiente. La transfección se llevó a cabo con fosfato cálcico tal como se describe en el **apartado 2.3.1** de Materiales y Métodos. A las 16 horas post-transfección se tripsinizaron las células transfectadas y se cultivaron junto a un exceso de células MDCK-V2 en una relación 1:10 en medio DMEM sin suero y suplementado con 2,5µg/ml de tripsina. Cuando el efecto citopático fue total, se recogieron los sobrenadantes, se realizó un ensayo de placa y se aislaron clones individuales tal y como se describe en el **apartado 3.4** de Materiales y Métodos. Posteriormente se prepararon lotes de trabajo de dichos clones. En cada una de las etapas se aisló el RNA y se amplificaron los segmentos M y NS de cada clon por RT-PCR y se procedió a su secuenciación, tal y como se describe en el **apartado 5.2.2** de Materiales y Métodos.

3.9. Selección de virus mutantes mediante *cell-sorter*

Para la selección de mutantes defectivos en el bloqueo de la respuesta interferón se infectaron células A549/pr(IFN-β).GFP a una mdi de 0,04 ufp/célula. A las 8 horas post-infección se

tripsinizaron las células, se resuspendieron en PBS libre de Mg^{2+} y Ca^{2+} y se pasaron a través de un filtro de 30 μm de poro para disgregar las células y obtener una suspensión de células individuales.

Se seleccionaron las células que expresaban GFP mediante *cell-sorter* usando el aparato Influx Cell Sorter (BD Bioscience) equipado con 5 láseres de estado sólido. Para ello se excitó la proteína GFP con un láser de 488nm y se recolectaron las células a través de un filtro 517/30. Los parámetros de *forward scatter* versus *side scatter* se usaron para excluir células muertas, estropeadas y agregados. Los datos correspondientes a 10.000 eventos individuales se analizaron usando el programa Summit 4.3 Software (DAKO).

Posteriormente, las células verdes seleccionadas se cultivaron dependiendo del caso de forma individual o conjunta sobre monocapas de células MDCK-V2 en medio DMEM sin suero y suplementado con 2,5 $\mu g/ml$ de tripsina. Cuando el efecto citopático fue total, se recogieron los sobrenadantes, se clarificaron y se guardaron congelados a $-80^{\circ}C$ para su posterior uso.

4. Manipulación de RNPs

4.1. Reconstitución de RNPs recombinantes

Se reconstituyeron RNPs con una etiqueta de poli-histidina en la subunidad PB2. Para ello se contranfectaron células HEK293T con una mezcla de plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa (pCMVPB1, pCMVPB2-HIS y pCMVPA), NP (pCMVNP) y el vRNA molde del que se trate (pHH*) en una relación de masa de 1:1:0,2:4:0,2. La mezcla de plásmidos se transfectó mediante coprecipitación con fosfato cálcico tal y como se describe en el **apartado 2.3.1** de Materiales y Métodos. Después de 24 horas de incubación a $37^{\circ}C$ se recogieron las células con PBS, se centrifugaron, y se guardó el precipitado a $-80^{\circ}C$ para su posterior análisis.

4.2. Purificación RNPs recombinantes

4.2.1. Obtención de extractos celulares

Las células se transfectaron según el protocolo descrito en el **apartado 4.1** de Materiales y

Métodos. Se recogieron cultivos de $3 \cdot 10^7$ células y se resuspendieron con 750 μl de tampón de lisis AT (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 7,5 mM sulfato amónico, 0,025% Igepal, 1 mM inhibidores de proteasas (Inhibitor Cocktail Complete, Roche)). Tras dos horas de incubación a $0^{\circ}C$ con *vortex* ocasional, el extracto se centrifugó a durante 20 min a $4^{\circ}C$ a 12.000 rpm. Finalmente se recogió el sobrenadante y se procedió a su purificación.

4.2.2. Purificación por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} -NTA-Agarosa

El sobrenadante de la extracción celular se diluyó en 4,5ml de tampón de unión a níquel TN20 (50mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 0,1% Igepal CA-630, 20mM Imidazol, 10mM β -Mercaptoetanol, 1U/ml de inhibidor de RNAsas HPRI (*Human Placental Ribonuclease Inhibitor*, Amersham), 1mM inhibidores de proteasas sin EDTA (Inhibitor Cocktail Incomplete, Roche)). Se incubó el extracto con 150 μl de cama de la resina Ni^{2+} -NTA (Probond, Invitrogen) a $4^{\circ}C$ durante 16-20 horas en agitación suave. La resina se lavó con 100 volúmenes del tampón TN20 en columna con vacío muy lento. Tras el lavado, el material unido a la resina se eluyó con dos lavados de 150 μl de tampón TE175 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 0,1% Igepal CA-630, 175mM Imidazol, 10mM β -Mercaptoetanol). El material obtenido se guardó a $0^{\circ}C$ para posteriores ensayos.

4.3. Transcripción *in vitro* de RNPs.

El ensayo de transcripción *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Perales *et al.*, 1996). RNPs purificadas según los protocolos descritos anteriormente (**apartado 3.7** y **4.2** de Materiales y Métodos) se incubaron con tampón de transcripción TT (50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 1mM DTT, 10 $\mu g/ml$ Actinomicina D, 1U/ μl de HPRI (Amersham), 1mM ATP, 1mM CTP, 1mM UTP, 10 μM GTP, 10 μCi $\alpha^{32}P$ -GTP (400 $\mu Ci/mmol$)). Se empleó como cebador de la transcripción 100 μM de ApG (Sigma). Tras 1 hora de incubación a $30^{\circ}C$ los productos de la reacción se precipitaron con 10% ácido tricloroacético (TCA) en presencia de 0,5 μg de RNA de levadura, y fueron filtrados en vacío sobre un filtro de *nylon* en un aparato de

Dot-blot. Tras sucesivos lavados con 5% TCA y 1% pirofosfato, se expuso la membrana con una pantalla sensible a ^{32}P (Molecular Dynamics) y se analizó la señal mediante el escáner STORM.

4.4. Transfección de RNPs

Primero se transfectaron las células HEK293T con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa (pCMVPB1, pCMVPB2 y pCMVPA) y NP (pCMVNP). La mezcla de plásmidos se transfectó mediante coprecipitación con fosfato cálcico tal y como se describe en el **apartado 2.3.1** de Materiales y Métodos. Después de 24 horas de incubación se retransfectaron dichas células con una mezcla de las 8 RNPs purificadas de viriones y de un exceso de RNPs recombinantes que expresaban la genoteca de NS (obtenidas según el protocolo descrito en el **apartado 3.7** y **4.2** respectivamente) con un protocolo modificado de la transfección de liposomas catiónicos (Rose *et al.*, 1991). A las 16 horas post-transfección se tripsinizaron las células transfectadas y se cultivaron junto a un exceso de células MDCK-V2 en una relación 1:10 en medio DMEM sin suero y suplementado con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tripsina. Cuando el efecto citopático fue total, se recogieron los sobrenadantes, se clarificaron y se guardaron a -80°C .

5. Análisis de RNA

5.1. Purificación de RNA

5.1.1. Purificación de RNA a partir de viriones

Los viriones presentes en el sobrenadante de células infectadas se incubaron a 37°C durante una hora en TNE, 0,5% SDS y proteinasa K (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A continuación se fenolizaron las muestras dos veces y se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante un mínimo de 2h a -20°C . Posteriormente se lavaron los precipitados en dos ocasiones con 2,5 volúmenes de etanol al 75%, se secaron suavemente y se resuspendieron en tampón DNAsa (10mM MgCl_2 , 1mM DTT, 1U/ μl del inhibidor de RNAsas HPRI (Amershan) y 50mM Tris-HCl pH 7.5). Se trataron las muestras con DNAsa libre de RNAsas (1U/ μg DNA) a 37°C durante 1h. Posteriormente se volvieron a fenolizar dos veces y se precipitaron con etanol tal y como se ha descrito anteriormente.

5.1.2. Purificación de RNA a partir de RNPs

El RNA proveniente de RNPs de viriones (obtenidas según el protocolo descrito en el **apartado 3.7** de Materiales y Métodos) se purificó siguiendo el mismo protocolo que en el **apartado 5.1.1**.

5.2. Análisis de RNA

5.2.1. Electroforesis desnaturalizante y tinción de plata

Para analizar los RNAs purificados a partir de viriones y a partir de RNPs (**apartado 5.1**) se resuspendieron en tampón de formamida (Bionova) y se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-6M Urea al 4%.

Los geles se fijaron con 25% etanol y 10% ácido acético durante 1 hora a TA. Los geles fijados se trataron 3 minutos con 1% ácido nítrico y posteriormente se incubaron 30 minutos con una solución sensibilizante (5% w/v tiosulfato sódico, 0,5M acetato sódico, 30% etanol). Tras 3 lavados con $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, se incubaron con nitrato de plata al 0,25% y se lavaron dos veces con $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ durante 1 minuto. Los geles se revelaron mediante una reducción con carbonato sódico al 2,96% y formaldehído al 0,03%. Tras el revelado, se paró la reacción con 10% ácido acético. Todas las soluciones se prepararon en $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

5.2.2. RT-PCR

Se utilizó la técnica de RT-PCR con la finalidad de obtener el cDNA de los segmentos PB1, PB2, PA, M y NS a partir del RNA aislado de virus. Para ello se utilizó el kit Titan One Tube RT-PCR System (Roche) y oligonucleótidos específicos para amplificar cada segmento, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados están reflejados en el **Anexo 1**.

Alternativamente, se realizó la misma técnica de RT-PCR para comprobar la presencia de los RNAs defectivos descritos en el análisis de los datos de ultrasecuenciación a partir de RNA purificado de viriones. Para ello se usaron oligonucleótidos específicos que hibridaban en la zona de fusión (**Anexo 1**).

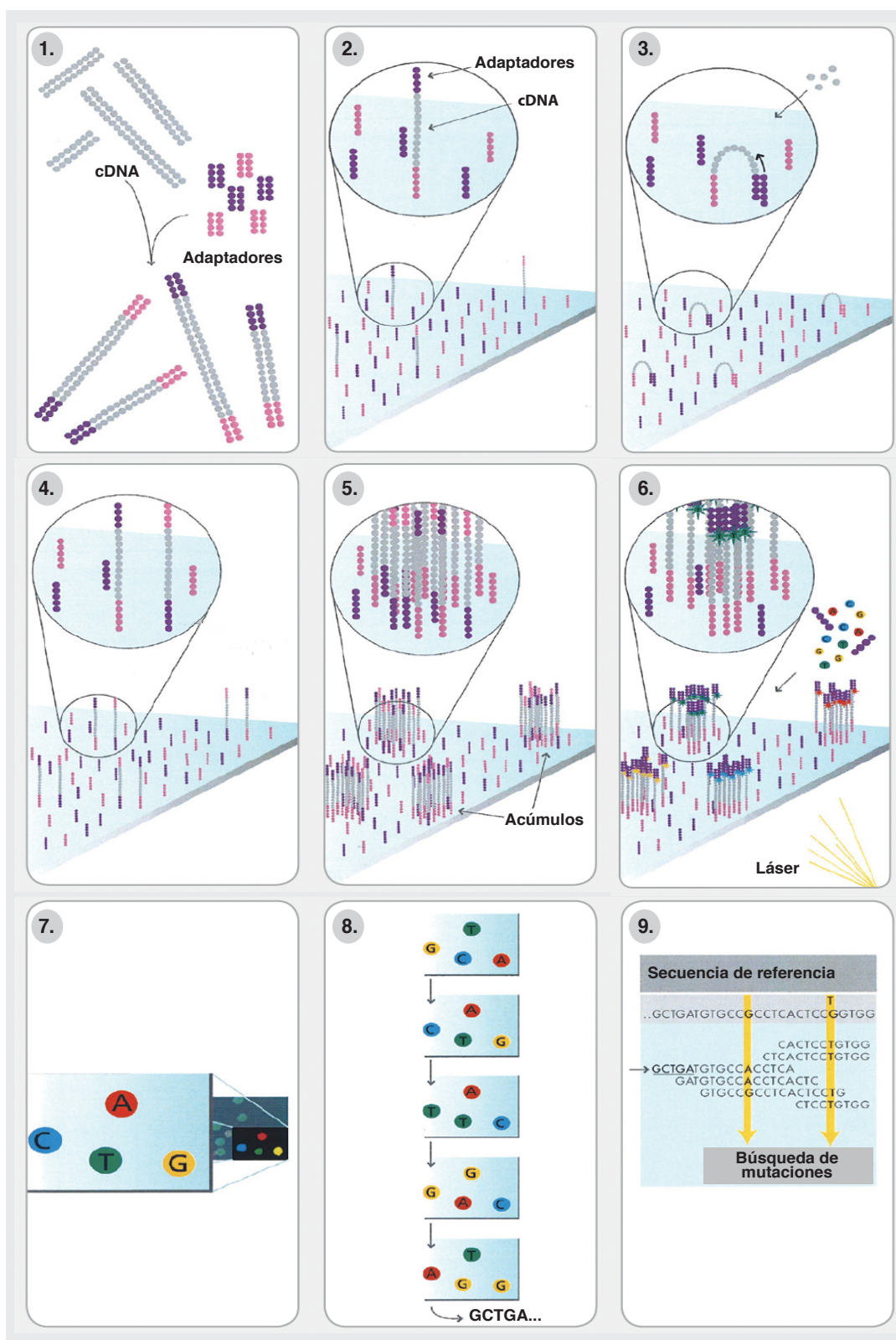


Figura M1. Ultrasecuenciación por el método de Solexa Illumina.

Esquema que representa los diferentes pasos necesarios para la secuenciación de RNA por la técnica de Solexa Illumina. **1)** Fragmentación al azar de la librería de cDNAs y ligación de los adaptadores a ambos extremos de los fragmentos. **2)** Unión de los fragmentos de ssDNA de forma aleatoria sobre la superficie en la que se va a realizar la secuenciación. **3)** Amplificación de los fragmentos para formar dsDNA. **4)** Paso de desnaturalización para obtener moléculas de ssDNA. **5)** Generación de acúmulos de ssDNA provenientes de una molécula inicial. **6)** Secuenciación de los fragmentos. **7)** Excitación por láser y obtención de una imagen que permite identificar el nucleótido incorporado en cada caso. **8)** Repetición de los ciclos de secuenciación para determinar la secuencia de bases de cada fragmento. **9)** Alineamiento de las secuencias obtenidas contra una secuencia de referencia e identificación de las diferencias (Adaptado de (Illumina, 2007)).

5.2.3. Ultrasecuenciación

Los RNAs purificados a partir de viriones según el protocolo del **apartado 5.1.1** de Materiales y Métodos se secuenciaron con la técnica de Solexa Illumina que permite secuenciar moléculas individuales. Para ello se prepararon librerías de cDNA a partir del RNA purificado de viriones siguiendo el protocolo de preparación de librerías de RNA para secuenciación de Illumina, pero omitiendo el paso de aislamiento de RNA poli-A⁺. Brevemente, se fragmentaron 100ng de RNA usando el reactivo de fragmentación del kit de Illumina (RS-930-1001). La síntesis de la primera y segunda cadena de cDNA se realizó tal como recomienda los fabricantes del producto, siguiendo los pasos de reparación de extremos, elongación de A y unión de las secuencias adaptadoras. Se usaron adaptadores propios que permiten introducir un código de 4 bases en el extremo 5' de la secuencia leída. Posteriormente, se seleccionaron los fragmentos de cDNA unidos al adaptador que tenían un tamaño de entre 150 y 180 nucleótidos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Finalmente se amplificó la librería mediante una PCR de 15 ciclos. Se confirmó la calidad de la librería mediante el aparato Bioanalyser DNA 1000 chip y se cuantificó usando el kit de cuantificación de Kapa (Kapa Library Quantification Kit, Kapa Biosystems).

Las 7 librerías pertenecientes a las poblaciones totales (6 poblaciones MDCK V1-V6 y una población control MDCK-N) se secuenciaron juntas en una única línea de secuenciador *Genome Analyzer (GA) IIx* usando el protocolo de ciclo 108 y la secuenciación química v5 GA de Illumina. La asignación de bases se realizó usando la versión 1.7.0 del programa Illumina Pipeline (dentro de SCS 2.8). Para las librerías correspondientes a los mutantes individuales se usó el secuenciador HiSeq2000 usando el protocolo de secuenciación de lecturas largas *Paired-End* 2x50 y la secuenciación química HiSeq. La asignación de bases se realizó usando la versión 1.8.1 del programa Illumina Pipeline (dentro de SCS 1.4.8). Todo el proceso de ultrasecuenciación se llevó a cabo en el servicio del *Centre de Regulació Genòmica* (CRG) de Barcelona. En la **Figura M1** se muestra un esquema del funcionamiento de la técnica.

6. Análisis de proteínas

6.1. Inmunofluorescencia

Se prepararon cultivos de células A549 sobre cristales de 10mm de diámetro. Tras su infección, las células se lavaron con PBS, y se dejaron fijando con formaldehído al 1% a 4°C durante un mínimo de 12 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS tres veces y se permeabilizaron con 0,5% Tritón-X-100 durante 5 minutos a TA. Tras realizar tres lavados con PBS se incubaron las células con el anticuerpo primario diluido en PBS-1% BSA durante 1h a TA en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron las células con el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo diluido en PBS-1% BSA durante 1h a TA, en cámara húmeda y oscuridad. Finalmente las células se lavaron tres veces con PBS, una vez con H₂O_{mQ} y las preparaciones se montaron con el reactivo ProLong (Invitrogen). Las imágenes se analizaron en un microscopio confocal Leica TSC SP5.

La tinción del DNA de los núcleos celulares se realizó con el reactivo DAPI (rojo lejano). Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la **Tabla M2**.

Tabla M2. Relación de anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia		
Anticuerpo	Procedencia	Dilución
NS1	Rata	1:1000
NP	Conejo	1:5000
Ac. secundarios		1:400

6.2. Western-Blot

El análisis de proteínas se realizó mediante su separación en electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado y transferencia a membranas de Immobilon (Millipore). Los filtros se bloquearon con una solución PBS-5% leche desnatada antes de su incubación con anticuerpos específicos. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-5% leche desnatada durante una hora a TA o durante 14-16 horas a 4°C según el anticuerpo utilizado. Tras cuatro lavados con PBS-0,25% Tween 20 se incubaron

Tabla M3. Relación de anticuerpos utilizados en ensayos de Western Blot

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
NS1	Conejo	1:5000
NP	Conejo	1:5000
M1-M2	Ratón	1:200
β -actina	Ratón	1:2000
p-IRF3	Conejo	1:1000
Mx1/2/3	Conejo	1:1000
ISG56	Cabra	1:1000
p-Akt	Ratón	1:1000
Akt	Conejo	1:1000
Stat1	Conejo	1:1000
p-eIF2 α	Conejo	1:1000
c-caspasa 3	Conejo	1:1000
Anti ratón	Cabra	1:3000
Anti conejo	Cabra	1:40000
Anti cabra	Ratón	1:10000

con los anticuerpos secundarios preparados en PBS-5% leche desnatada. Las diluciones de los anticuerpos utilizados se resumen en la **Tabla M3**. La señal de los anticuerpos secundarios se detectó mediante reacciones de quimioluminiscencia (Amersham).

En el caso de anticuerpos que detectan formas fosforiladas de proteínas, se sustituyó el PBS por TBS durante todo el proceso, y la leche desnatada por BSA en el paso de incubación con el anticuerpo primario, asegurándose de lavar bien los restos de la solución de bloqueo.

6.3. Medición de GFP

Para medir la inducción de GFP bajo el promotor de INF- β por los diferentes mutantes, se infectaron células A549/pr(IFN- β).GFP a una mdi de 5 ufp/célula. Después de 10 horas de infección se tripsinizaron las células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en una solución de formaldehído al 1% en PBS durante 14 horas a 4°C para su fijación. Posteriormente, se lavaron con PBS y se midió la expresión de GFP con el citómetro FACScan Flow. Los datos se analizaron usando el programa FlowJo (Treestar).

6.4. Medición de luciferasa

Para medir la inducción de luciferasa bajo el promotor ISRE se infectaron pocillos de placas M24 con células A549/pr(ISRE).Luc o A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N^{pro} a una mdi de 5 ufp/célula. Después

de 7 horas de incubación a 37°C se añadió 10⁴U/ml de INF- α (Roteferon A, Roche) en los pocillos correspondientes. Los extractos celulares se recogieron a 13 horas post-infección y la expresión de luciferasa se determinó usando el Kit Luciferase Assay System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.5. Medición de IFN mediante bioensayo

La cantidad de IFN en el sobrenadante de células infectadas se determinó mediante un bioensayo en el que se monitorizó la reducción del efecto citopático causada por un virus sensible a IFN. Para ello se infectaron cultivos de células A549 con los diferentes virus a una mdi de 5 ufp/célula y se incubó en DMEM 2%FBS a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000rpm para eliminar los restos celulares, y se inactivo el virus residual mediante tratamiento con luz ultravioleta (UV). A continuación, se trataron monocapas de células A549/BVDV-N^{pro} durante 24 horas con diluciones seriadas 1:2 de los sobrenadantes inactivados, seguida de una infección con el virus ECMV a baja multiplicidad de infección (0,05 ufp/célula). Después de 2-3 días de incubación a 37°C, y cuando el efecto citopático era visible, se fijaron las monocapas y se tiñeron con cristal violeta para monitorizar el efecto citopático. Se calculó el título en unidades arbitrarias a partir del número de pocillos protegidos, usando como referencia una curva estándar de IFN- α .

7. Análisis de secuencias

Todo el procesamiento bioinformático de los datos de ultrasecuenciación masiva ha sido realizado por Juan Carlos Oliveros del servicio de Genómica Computacional del Centro Nacional de Biotecnología.

7.1. Alineamiento de secuencias

El un paso previo se eliminaron los 4 nucleótidos que sirven como adaptador de cada librería de secuencias. Después de este paso, se obtuvieron más de 4 millones de secuencias cortas de 76 nucleótidos de longitud para cada una de las muestras pertenecientes a las poblaciones totales (6 poblaciones MDCK V1-

V6 y una población control MDCK-N). En el caso de librerías correspondientes a los mutantes individuales se obtuvieron más de 20 millones de secuencias “paired-end” de 46 nucleótidos de longitud.

Se alinearon las secuencias cortas contra la secuencia de referencia de los 8 segmentos del genoma de la cepa Victoria usando el algoritmo BWA (Li & Durbin, 2009). En todos los casos los parámetros de BWA se establecieron para permitir un máximo de 5 cambios de base y sin huecos (-n 5 -o 0). Posteriormente se usó SAMtools (Li *et al.*, 2009) para manejar los archivos de alineamientos que se habían generado mediante BWA.

7.2. Búsqueda de deleciones

Para detectar deleciones de cualquier tamaño en las muestras correspondientes a los mutantes individuales se usó la siguiente estrategia: 1) Se realizó un alineamiento de todas las secuencias con el programa BWA permitiendo un máximo de 2 cambios de base y sin huecos (-n2 -o 0). 2) Se seleccionaron las secuencias cortas que no se podían alinear. 3) De ese conjunto, se dividió cada fragmento de 46 nucleótidos en dos fragmentos de 23 nucleótidos cada uno. 4) Cada fragmento se alineó de forma independiente contra el genoma de la cepa Victoria usando el programa BWA permitiendo únicamente un cambio de base y sin espacios. 4) Se recopilieron todos los casos en los cuales los dos fragmentos alineaban con una distancia mínima de 38 nucleótidos. 5) Para obtener otras uniones compatibles con alineamientos en los que ambos fragmentos no quedarán situados exactamente en el centro de 46 nucleótidos, se repitió el proceso completo con un abanico de combinaciones diferentes (fragmentos con tamaños de 20n-26nt, 21-25nt, 22-24 nt, 24-22nt, 25-21nt y 26-20nt). 6) Para cada muestra, se consideraron válidos aquellos fragmentos que cumplían los requisitos anteriores, y que aparecían repetidos un mínimo de dos veces.

RESULTADOS

El sistema interferón es una potente estrategia antiviral que es capaz de controlar la mayoría de las infecciones virales. A pesar de esta respuesta, la mayoría de los virus son capaces de producir infecciones y enfermedades. Esto es debido a que han desarrollado estrategias para evadir dicha respuesta. En el caso del virus de la gripe, es la proteína NS1 el principal antagonista de la respuesta IFN. Se ha descrito que esta proteína es capaz de bloquear esta respuesta a varios niveles. Un virus mutante que carece de NS1, denominado delNS1, únicamente es capaz de multiplicarse eficazmente en células que tengan afectado este sistema, mientras que un virus silvestre no presenta esta limitación (García-Sastre *et al.*, 1998). Aunque se conocen algunos de los mecanismos por los cuales NS1 es capaz de bloquear la respuesta IFN, este proceso todavía no está completamente caracterizado.

Parece evidente la importancia de entender bien los mecanismos generados por el virus de la gripe para contrarrestar la respuesta antiviral de la célula, y comprender si además de NS1 existen otros genes virales implicados. Por este motivo, en esta Tesis nos planteamos generar y caracterizar una colección de mutantes virales afectados en el bloqueo de la respuesta IFN, utilizando dos estrategias experimentales complementarias.

1. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES AFECTADOS EN EL BLOQUEO DE LA RESPUESTA INTERFERÓN MEDIANTE MUTAGENESIS AL AZAR: IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA NS1 EN EL BLOQUEO DE LA RESPUESTA IFN

Como primera estrategia se realizó un mutagénesis al azar del segmento de RNA viral que codifica NS1. Además de permitirnos profundizar en los mecanismos desarrollados por el virus para contrarrestar dicha respuesta y en el papel específico de NS1 en este bloqueo, esta estrategia permitiría desarrollar una potente herramienta para la generación de virus potencialmente atenuados para su posible uso en vacunas.

1.1. Generación de mutantes puntuales al azar en el segmento NSVic

Para introducir mutaciones puntuales al azar en el segmento NS se realizó una PCR en condiciones mutagénicas utilizando análogos de nucleótido (dPTP y 8-oxo-dGTP). Se utilizó una concentración de análogos que permitiera la incorporación de 5 ó 6 cambios de nucleótido por segmento, lo que significa alrededor de 3 cambios de aminoácido. Para hallar dicha concentración se realizó una curva de dosis de los análogos de nucleótido, se clonaron los productos obtenidos y se secuenciaron clones individuales. Como molde se usó el plásmido pHHNSVic. Posteriormente, el producto de PCR se clonó en el plásmido pHH21 que permite reconstituir RNPs *in vivo* (Neumann *et al.*, 1999). Una vez realizado el clonaje, se procedió a la amplificación de la genoteca de plásmidos. En total se obtuvieron entre 30.000 y 40.000 clones diferentes. En la **Figura R1** se representan esquemáticamente los pasos seguidos y la metodología utilizada se detalla en el **apartado 1.1** de Materiales y Métodos.

1.2. Rescate de virus por transfección de RNPs

Anteriormente, en el laboratorio se había desarrollado un método para el rescate de virus mediante transfección de RNPs (Garaigorta *et al.*, 2005; López-Turiso & Ortín, 1988). Se basa en que las RNPs de viriones contienen la información genética del virus de la gripe y cada RNP lleva asociada una polimerasa viral capaz de llevar a cabo el proceso de transcripción. De esta forma, al transfectar las 8 RNPs virales en una célula, se generan viriones infectivos.

El primer paso fue la purificación de RNPs silvestres a partir de viriones mediante un gradiente de glicerol, tal y como se detalla en el **apartado 3.7** de Materiales y Métodos. Se seleccionaron aquellas fracciones que contenían las RNPs del virus y que eran funcionalmente activas mediante análisis por *Western-blot* y ensayo de transcripción *in vitro* respectivamente. Adicionalmente, se demostró que las 8 RNPs del virus estaban presentes en las fracciones seleccionadas mediante electroforesis desnaturante y tinción con plata del RNA presente en ellas (datos no mostrados).

PCR sobre el segmento NS
en condiciones mutágenicas

PCR en condiciones estandar para
eliminar análogos de nucleótido

Clonaje en el plásmido pHH
con BsmB1

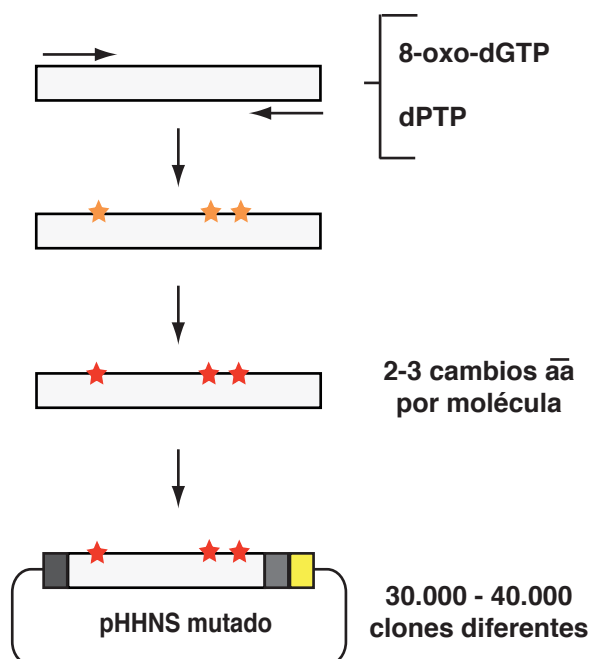


Figura R1. Representación esquemática de la estrategia de mutagénesis seguida para obtener una genoteca de mutantes puntuales en el segmento NS.

Se realizó una PCR sobre el segmento NS en la que se incluyeron análogos de nucleótidos en una proporción determinada. El sistema se puso a punto para producir entre 2 y 3 cambios de aminoácido por molécula. En una segunda PCR en la que no se usaron análogos de nucleótido se fijaron las mutaciones en el DNA. Posteriormente el segmento ya mutagenizado se clonó en el plásmido pHH para su posterior uso. De esta forma se obtuvo una genoteca de plásmidos de 30.000 - 40.000 mutantes diferentes.

Posteriormente se procedió a transfectar dichas RNPs en células para la generación de nuevas partículas virales infectivas (**apartado 4.4** de Materiales y Métodos). Para aumentar la eficacia del rescate, dicha transfección se realizó sobre células HEK293T que expresaban las tres subunidades de la polimerasa y NP y las células transfectadas se usaron para generar centros infectivos sobre células permisivas MDCK. Así se determinó la cantidad mínima de RNPs virales que hay que transfectar para poder rescatar virus.

1.3. Rescate de RNPs mutantes mediante transfección competitiva

A continuación se quisieron introducir las mutaciones al azar, presentes en la genoteca de plásmidos pHHNSVic, en el genoma del virus de la gripe. Esta genoteca de mutaciones se transfirió a RNPs recombinantes mediante reconstitución in vivo. Las RNPs se obtuvieron por co-transfección con la genoteca pHHNSVic y los plásmidos que expresan la polimerasa viral y la NP. Las RNPs producto de replicación in vivo se purificaron mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺-NTA-Agarosa, dado que la polimerasa

contenía una etiqueta His (**apartados 4.1 y 4.2** de Materiales y Métodos). Para transferir a virus las RNPs mutantes generadas el abordaje utilizado fue una versión modificada del rescate de virus silvestre. En este caso se realizó una co-transfección de una mezcla de RNPs de viriones y un exceso de la genoteca de RNPs mutantes, esperando que estas últimas se incorporasen por competición en los nuevos viriones generados. A continuación, se realizó un ensayo de centros infectivos tal y como se describe en el **apartado 2.4** de Materiales y Métodos, y cuando el efecto citopático fue total se recogió el sobrenadante.

Para determinar la proporción adecuada que hay que transfectar de ambos tipos de RNPs para obtener la máxima eficiencia de incorporación de las RNPs mutantes, se utilizaron RNPs NS del virus de la cepa WSN. La proteína NS1 de dicha cepa presenta un peso molecular, y por tanto una movilidad electroforética, distinta a la de la cepa Victoria, permitiendo así su diferenciación. Se rescataron virus usando este sistema de transfección competitiva con cantidades crecientes de RNPs recombinantes NS WSN y una dosis idéntica de RNPs de viriones Vic y se recogieron los sobrenadantes. Se

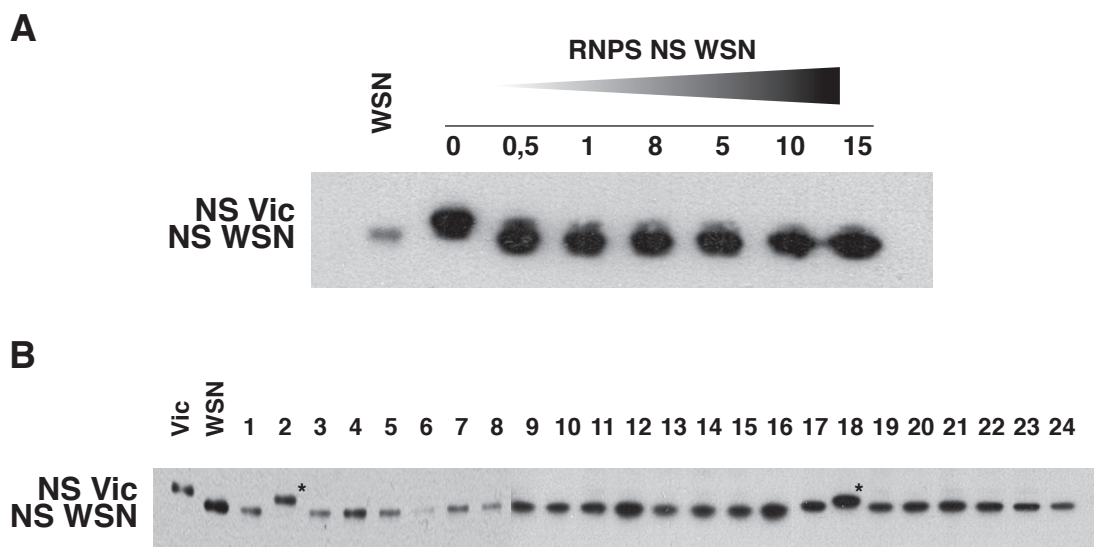


Figura R2. Eficacia de incorporación de la RNP NS WSN en el entorno genético de la cepa Vic.

A) Se infectaron células MDCK con el sobrenadante mixto obtenido del experimento de rescate de virus recombinantes mediante co-transfección de RNPs de virus Vic o incluyendo además cantidades crecientes de RNPs NS WSN. Como control se infectaron células con el virus WSN. A las 6 hpi se recogieron extractos y se analizó la expresión de NS1 por *Western-blot*. **B)** Se infectaron células MDCK con el sobrenadante de clones individuales aislados a partir de un rescate de virus en las condiciones determinadas como óptimas en el panel anterior. Como control se infectaron células con los virus Vic y WSN. A las 6 hpi se recogieron extractos y se analizó la expresión de NS1 por *Western-blot*. De 24 clones, únicamente los marcados con * no incorporaron la RNP exógena.

infectaron células con ellos y se analizaron los extractos mediante *Western-blot* con anticuerpos anti-NS1. De esta forma se pudo determinar qué porcentaje de la población viral expresaba la RNP recombinante (**Figura R2.A**). Una vez determinadas las condiciones óptimas, se usaron éstas para realizar un nuevo rescate en el que se analizaron mediante *Western-blot* clones individuales de los virus generados. De esta forma, se pudo calcular que más del 90% de los virus habían incorporado la RNP NS WSN (**Figura R2.B**).

1.4. Generación de virus mutantes puntuales al azar del segmento NSVic

Una vez optimizadas las condiciones para el sistema de rescate por competición de RNPs se generaron virus mutantes del segmento NS. Se realizaron en paralelo dos ensayos independientes de rescate utilizando una genoteca de RNPs NS Vic mutantes y RNPs de viriones silvestres. Todos los rescates se realizaron sobre células MDCK-V2. Estas células son una variante de la línea celular MDCK que

expresa de forma estable la proteína V del virus Parainfluenza de tipo II, la cual degrada el factor celular STAT1, clave para la respuesta celular a IFN (Precious *et al.*, 2005). Cabe esperar que aquellos mutantes puntuales que se encuentren afectados en el bloqueo de la respuesta IFN puedan desarrollarse de forma normal en este tipo celular, siempre y cuando no estén afectados en otras funciones importantes del virus. De esta forma se obtuvieron 2 lotes de virus recombinantes en células MDCK-V2 que mantenían la variabilidad genética presente en la genoteca de plásmidos. A partir de dichos lotes se aislaron clones individuales, y se secuenció el segmento NS, comprobando que al menos el 70% de los clones presentaban mutaciones puntuales. La disminución de la eficiencia comparada con la obtenida en el rescate de RNPs NS WSN es esperable si tenemos en cuenta que parte de las mutaciones introducidas pueden ser letales. En la **Figura R3** se representa un esquema de la metodología seguida para la obtención de virus mutantes puntuales al azar.

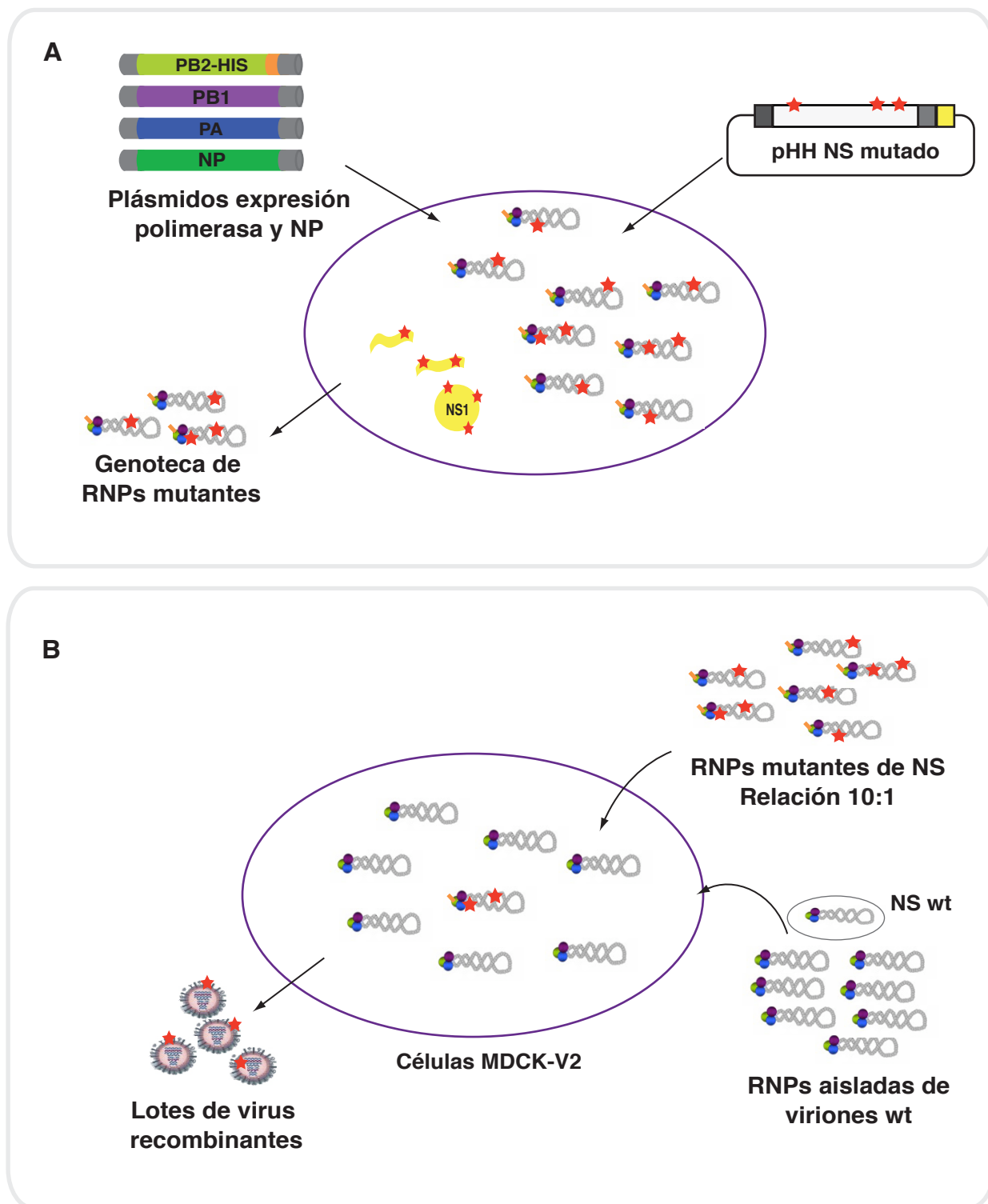


Figura R3. Representación esquemática del proceso seguido para la obtención de virus mutantes puntuales al azar en el segmento NS.

A) Reconstitución de RNPs recombinantes mediante transfección de los plásmidos de expresión de polimerasa viral y NP junto con la genoteca de plásmidos pHHNSVic en células HEK-293T. **B)** Rescate de virus recombinantes mediante co-transfección de RNPs aisladas de viriones y un exceso de RNPs recombinantes mutantes en NS.

1.5. Selección de virus afectados en el bloqueo de la respuesta IFN a partir de genotecas de virus mutantes

Para identificar virus mutantes potencialmente afectados en el bloqueo de la respuesta IFN se procedió a infectar células A549 que expresan la proteína GFP bajo el control del promotor IFN (A549/pr(IFN- β). GFP cells)(Chen *et al.*, 2010), con las genotecas de virus mutantes. Las infecciones se llevaron a cabo a baja multiplicidad de infección (0,04 ufp/célula) para disminuir la probabilidad de que una célula resulte infectada por dos virus a la vez o por DIs potencialmente presentes en las genotecas, usando infecciones en paralelo con el virus silvestre como control. A las 8 horas de infección, cuando los niveles de expresión de GFP son suficientes pero el virus todavía no ha completado su ciclo productivo, se seleccionaron mediante *cell-sorter* aquellas células que expresaban GFP. Las células individuales seleccionadas se sembraron sobre microcultivos de células MDCK-V2 con la intención de aislar clones individuales de virus. De un total de 600 microcultivos, 93 mostraron signos claros de infección y se procedió a recoger los sobrenadantes correspondientes.

Para comprobar de nuevo la inducción de GFP se infectaron células A549/pr(IFN- β). GFP a alta multiplicidad con los sobrenadantes de los microcultivos positivos y se determinó mediante citometría de flujo la expresión de GFP inducida por los mismos. Además, se

realizaron experimentos de rendimiento relativo de infección en células MDCK-V2 *versus* MDCK y ensayos de inducción de ISGs con aquellos virus que presentaban un fenotipo más marcado (este tipo de experimentos se explicaran con detalle más adelante). Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron 12 virus mutantes para su posterior secuenciación.

1.6. Análisis genotípico de los virus mutantes seleccionados

Para determinar las mutaciones presentes en el segmento NS de los virus mutantes seleccionados, se aisló el RNA de los viriones y se amplificó por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para dicho segmento, tal y como se describe en los **apartados 5.1.1 y 5.2.2** de Materiales y Métodos. Se secuenciaron los productos de PCR obtenidos y se alinearon con la secuencia del segmento NS Vic silvestre. Las mutaciones obtenidas se detallan en la **Tabla R1** y en la **Figura R4**.

Únicamente se reflejan 7 de los 12 mutantes. Los otros 5 no presentaron mutaciones en el segmento NS. Esto no es sorprendente, ya que una pequeña proporción de células infectadas con el virus silvestre es capaz de inducir la expresión de GFP (**Figura R5**) y este fenotipo puede interpretarse como resultado de mutaciones espontáneas presentes en la población de virus.

Los datos obtenidos son consecuentes con el método de mutagénesis usado. Los virus

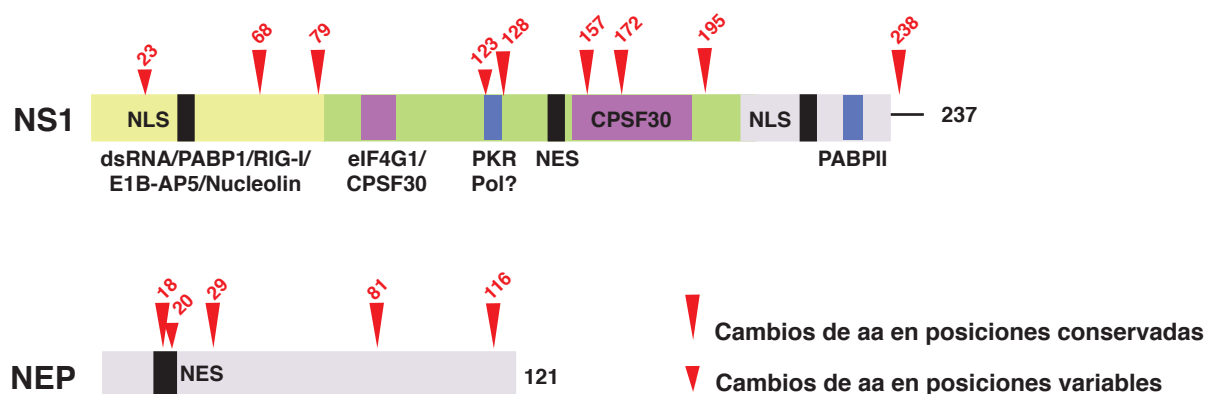


Figura R4. Representación esquemática de las proteínas NS1 y NEP y localización de las mutaciones obtenidas en los diferentes clones seleccionados.

Las flechas altas indican posiciones conservadas en las bases de datos de secuencias de gripe y las flechas pequeñas posiciones variables.

Tabla R1. Resumen de las mutaciones encontradas en los clones seleccionados						
MUTANTE	POSICIÓN	CAMBIO NT	CAMBIO AA NS1	FRECUENCIA APARICIÓN	CAMBIO AA NEP	FRECUENCIA APARICIÓN
1	551 584	A-G A-G	- -	- -	K18S N29S	1N/4828 4S/4828
7	408 740 780	A-G A-G T-C	I128V STOP238W n/a	3A/6667 0W/6667 -	n/a E81G -	- 1D/4828 -
10	844	T-C	-	-	F116L	5L/4828
11	393 496 609	A-G T-C T-C	I123V V157A S195P	V 3 / 6667 0 / 6667	n/a n/a -	n/a n/a -
12	152 540	C-A G-A	- E172K	- 7 / 6667	n/a -	n/a -
14	94	T-C	V23A	V	n/a	n/a
16	229 261 392 476 557	T-C A-G A-G C-T A-G	I68T M79V - - -	0 / 6667 0 / 6667 - - -	n/a n/a n/a n/a Q20R	n/a n/a n/a n/a 22 / 4828

analizados presentan entre 1 y 5 cambios de nucleótido en el segmento NS. De los 17 cambios de nucleótido totales encontrados, 13 generaron cambios de aminoácido. Estos datos indican que el porcentaje de mutaciones no silenciosas fue del 76,4%. De los 13 cambios de nucleótido, 9 afectaron únicamente a la proteína NS1, 3 a NEP (NS2) y 2 de ellos a ambas fases de lectura. Para estudiar la posible relevancia de dichas mutaciones se analizó su conservación en las bases de datos de secuencias del virus de la gripe. La mayoría de las posiciones que se encontraron mutadas (11 de 13) son muy poco variables o están conservadas. Todos estos datos sugieren que el fenotipo de los virus seleccionados se debe a mutaciones en el segmento NS, pero no es posible descartar que otros cambios en el genoma puedan contribuir al fenotipo observado.

1.7. Análisis fenotípico de los virus mutantes seleccionados

De todos los virus obtenidos se seleccionaron como relevantes para esta Tesis los mutantes 11, 12, 14 y 16, teniendo en cuenta para ello tanto datos fenotípicos como genotípicos. La inducción de GFP después de infectar células A549/pr(IFN- β).GFP a alta multiplicidad con los clones individuales seleccionados se refleja en la **Figura R5**. Todos los virus analizados presentan

niveles de inducción del promotor INF- β más altos que el virus silvestre, en concordancia con el sistema de selección utilizado. Cabe destacar el mutante 12 que produce una inducción muy superior al resto, y casi tan alta como la generada por el virus delNS1.

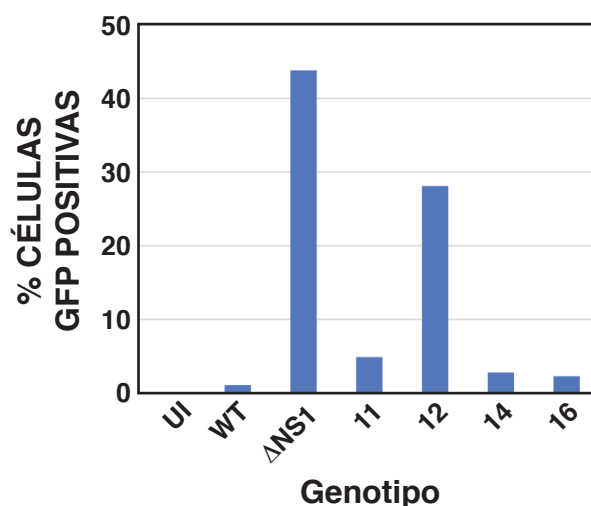


Figura R5. Inducción de GFP bajo el promotor de IFN del virus Vic, delNS1, o de los virus mutantes. Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549/pr(IFN- β).GFP con los virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados, a una mdi de 5 ufp/célula. Después de 10 horas de infección se recogieron las células y se midió la expresión de GFP mediante FACScan Flow. En cada caso se analizaron 10.000 células.

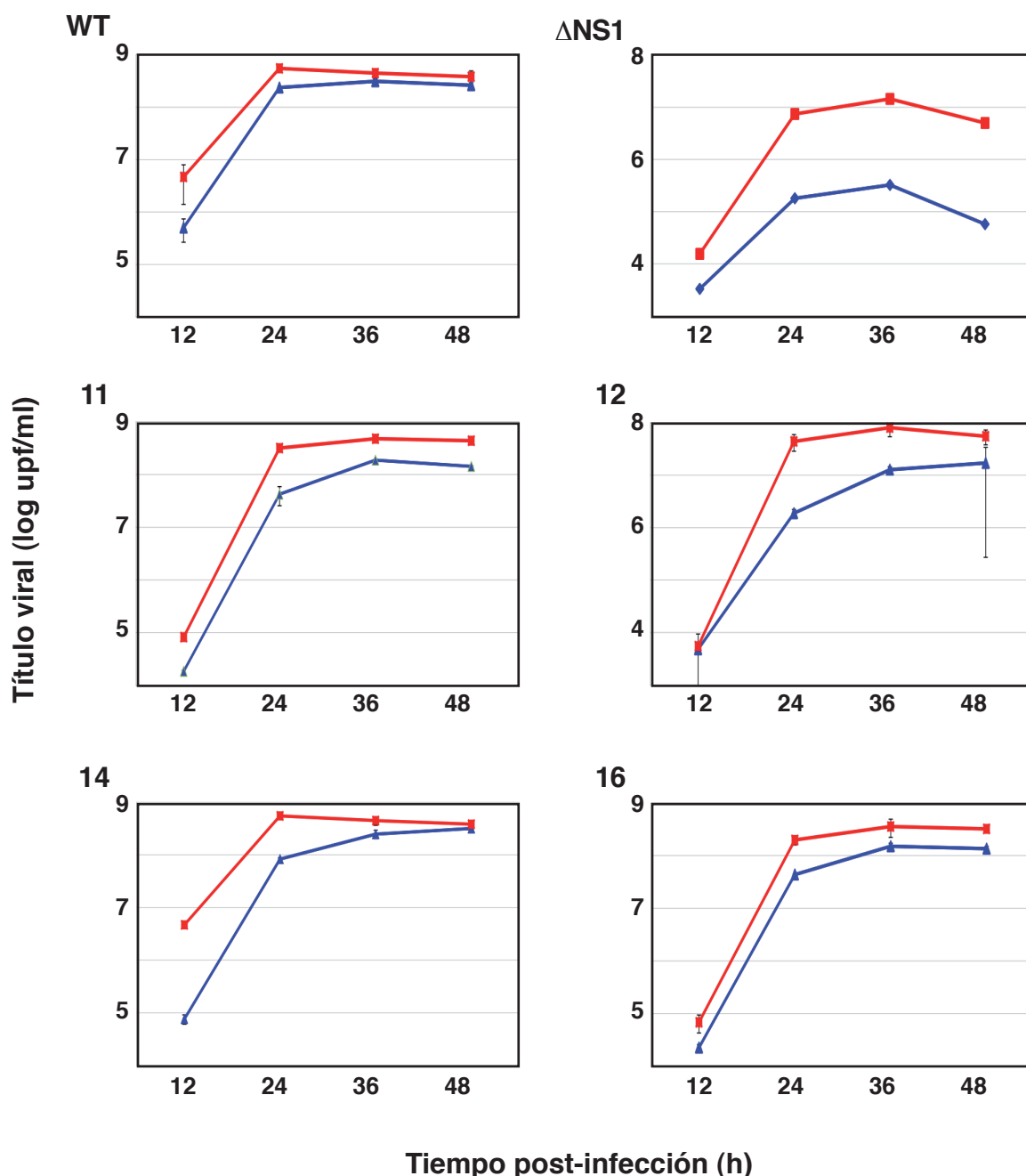


Figura R6. Cinética de crecimiento del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes en células MDCK o MDCK-V2.

Se infectaron células MDCK o MDCK-V2 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se recogieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa en células permisivas MDCK-V2. Los datos corresponden a un triplicado de infección.

Posteriormente, se procedió a analizar la eficiencia de replicación de dichos mutantes en células normales o en células deficientes en la respuesta IFN mediante la realización de cinéticas a baja multiplicidad de infección (**Figura R6**). Todos los virus son capaces de replicar eficazmente en ambos tipos celulares, aunque tal y como cabía esperar, los títulos obtenidos son superiores en las células permisivas,

especialmente para el mutante 12. El mutante 14 presenta un claro retraso en la cinética en células MDCK, aunque a tiempos finales las diferencias entre ambos tipos celulares se reducen (**Figura R6**). En la **Figura R7** se presenta la relación de título máximo en ambos tipos celulares.

Para analizar la posibilidad de que las mutaciones generadas modifiquen el ciclo de

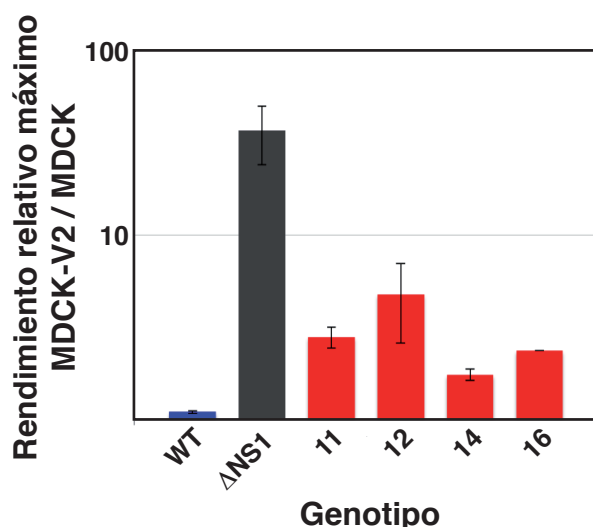


Figura R7. Rendimiento relativo máximo del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes en células MDCK o MDCK-V2.

Se infectaron células MDCK o MDCK-V2 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se recogieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa en células permisivas MDCK-V2. En la gráfica se representa el título relativo máximo en células MDCK-V2 respecto al obtenido en células MDCK. Los datos corresponden a un triplicado de infección.

infección del virus, se realizaron cinéticas a alta multiplicidad de infección en células A549 y se determinó la acumulación de las proteínas NP, NS1 y M a diferentes tiempos (**Figura R8**). Únicamente se observó una ligera disminución en la acumulación de proteínas en los mutantes en comparación con el virus silvestre, que era más acentuada en el mutante 12.

Puede ocurrir que aunque la proteína NS1 se exprese en cantidades relativamente normales, la localización de la misma se vea afectada en los virus mutantes durante el transcurso de la infección. Para estudiar esta posibilidad se analizó la localización de las proteínas NP y NS1 a diferentes tiempos post-infección mediante inmunofluorescencia (**Figuras R9 y R10**). No se observaron alteraciones importantes para ninguno de los virus analizados. La localización también era normal en el mutante 12, a pesar de mostrar una reducción en la acumulación de proteína. Estos resultados son consistentes con las cinéticas de replicación normales observadas anteriormente (**Figuras R6 y R7**) y confirman que los mutantes seleccionados no presentan defectos importantes en replicación en células no permisivas.

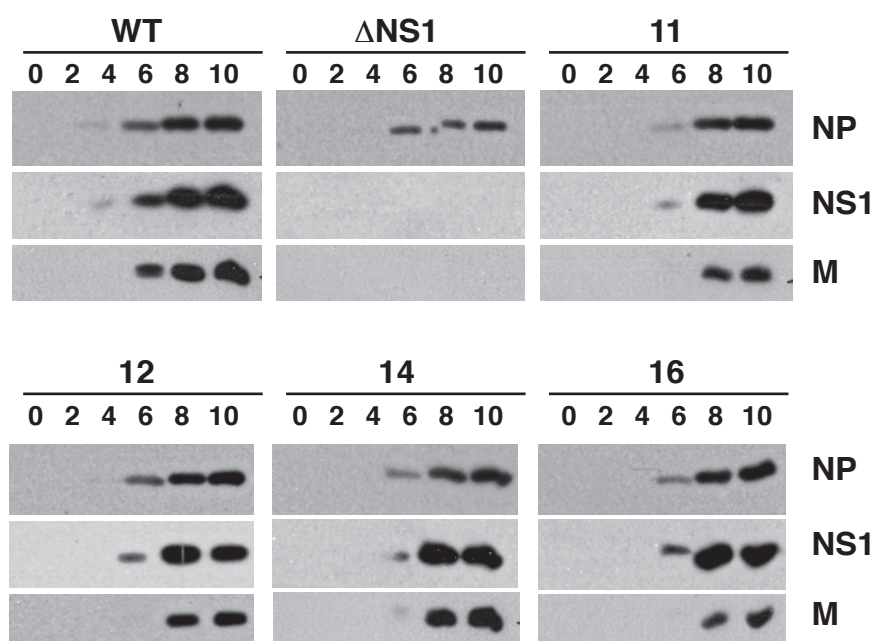


Figura R8. Cinética de acumulación de proteínas virales del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes.

Se infectaron células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de distintas proteínas virales (NP, NS1 y M) mediante *western-blot* con anticuerpos específicos. Los tiempos se indican en horas en la parte superior de los paneles.

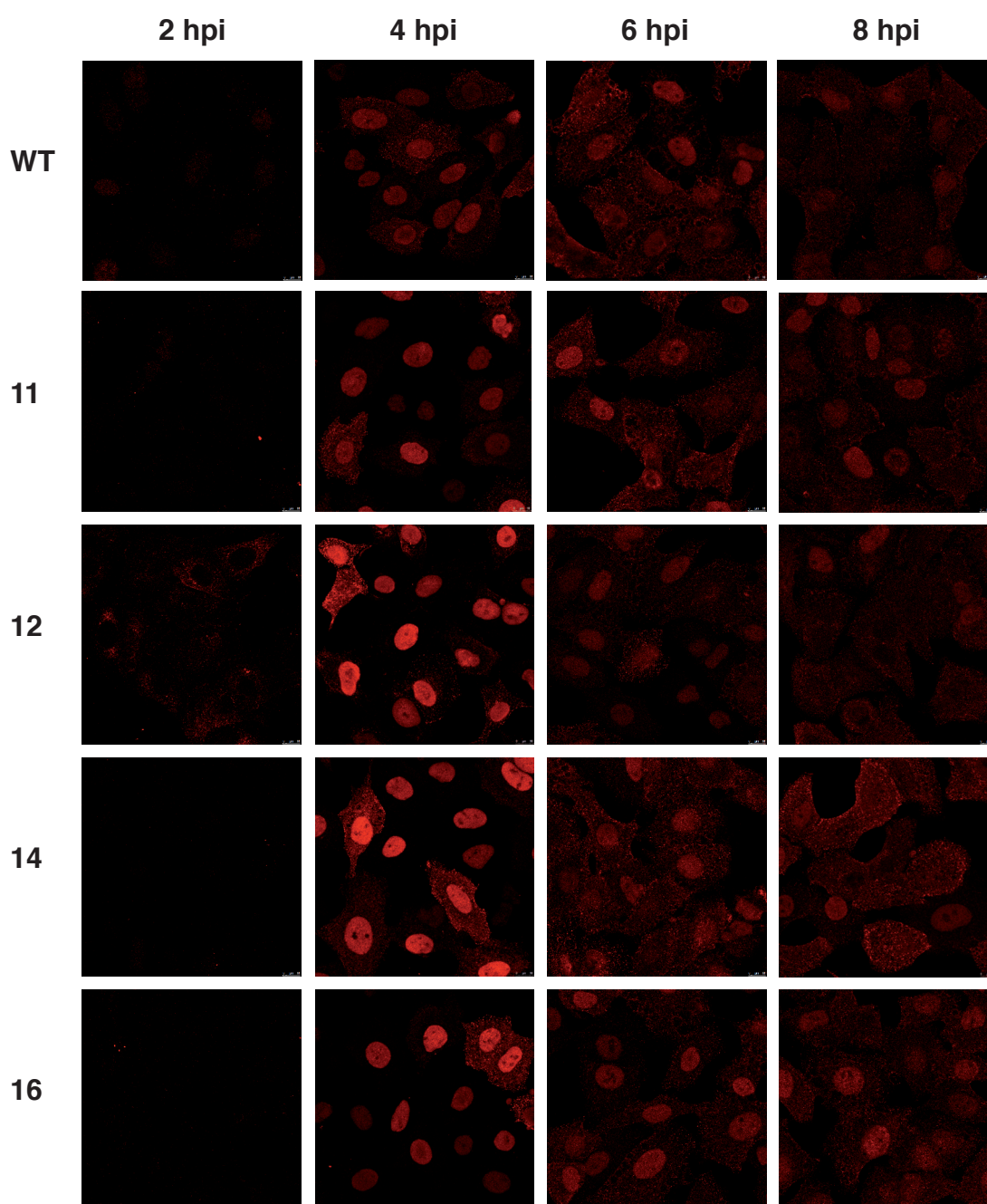


Figura R9. Cinética de localización de las RNPs durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes. Se infectaron células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se fijaron las células y se realizó un marcaje con anticuerpos específicos de la proteína NP como marcador de RNPs.

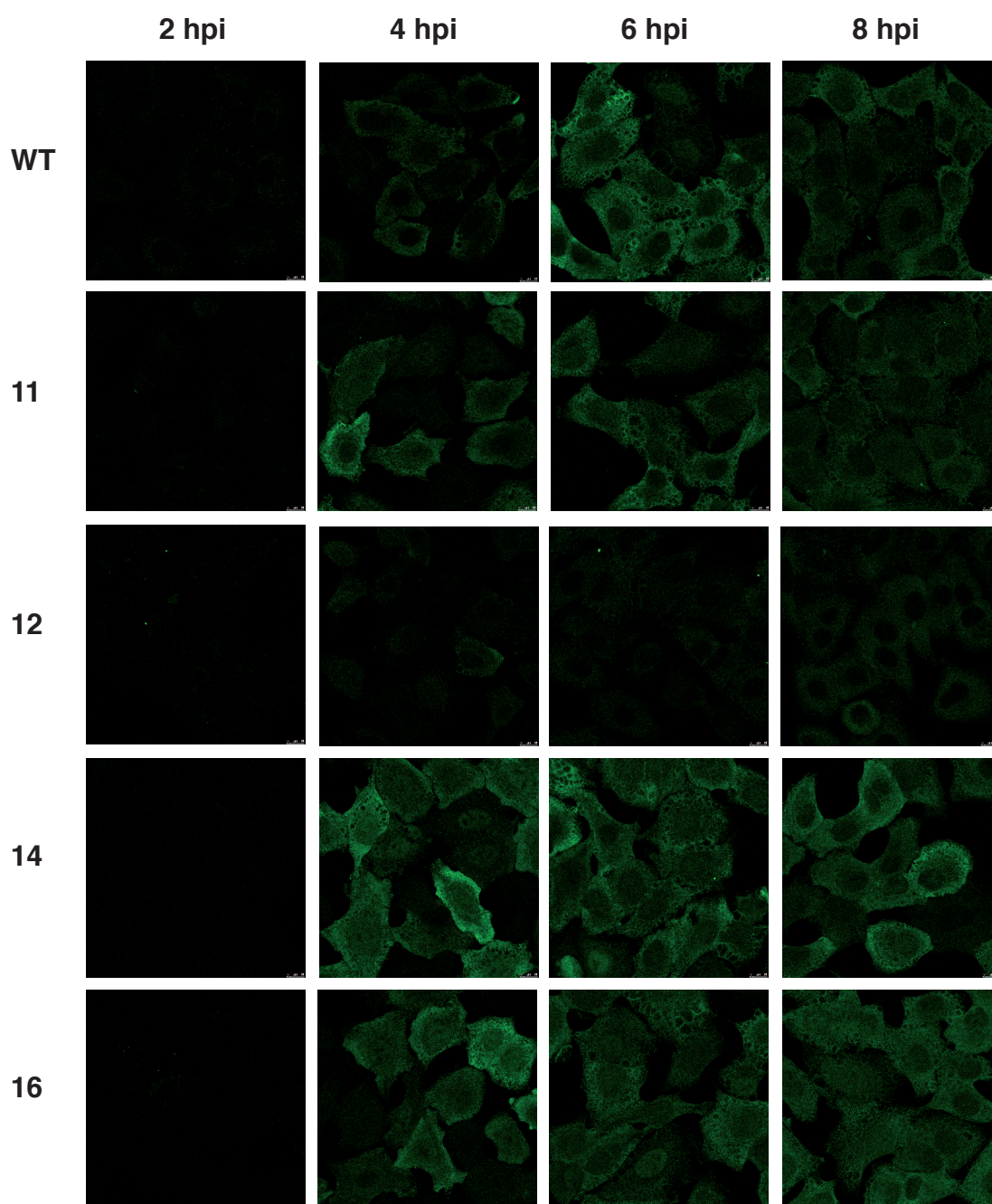


Figura R10. Cinética de localización de NS1 durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes.

Se infectaron células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se fijaron las células y se realizó un marcaje con anticuerpos específicos de la proteína NS1.

1.8. Análisis de la interacción de los virus mutantes con el sistema inmune innato celular

El método de selección usado para identificar virus mutantes se basa en la inducción de GFP bajo el control del promotor de IFN- β . Esto hace pensar que la infección con estos virus debería inducir una fuerte respuesta IFN en la célula. Para comprobar si esta predicción es cierta, se analizó si el sobrenadante de células infectadas era capaz de bloquear la replicación de un virus altamente sensible a IFN, como es ECMV. Para ello se infectaron células A549 a alta multiplicidad con los virus mutantes y con el virus Vic silvestre y delNS1 como controles. Después de 24 horas se recogieron los sobrenadantes y se inactivaron con luz UV. Se midió la capacidad de dichos sobrenadantes para bloquear la replicación del virus ECMV, usando como curva estándar la actividad obtenida con diluciones seriadas de IFN- α . En la **Figura R11** se muestran los resultados obtenidos como unidades arbitrarias. Todos los mutantes presentan al menos 10 veces más capacidad interferente que el virus silvestre, y el mutante 12 presenta una actividad antiviral superior, similar a la del virus delNS1. Estos datos correlacionan con la expresión de GFP obtenida en los experimentos mostrados anteriormente (**Figura R5**).

La presencia de moléculas con capacidad antiviral en el medio desencadena una segunda cascada en la célula (sistema JAK/STAT) que finalmente induce la expresión de genes con capacidad antiviral o ISGs. Para analizar la activación de la segunda parte de la cascada IFN mediada por los virus mutantes se infectaron células A549/pr(ISRE).Luc que expresan luciferasa bajo el control del promotor ISRE. Las infecciones se realizaron a alta multiplicidad con el virus Vic silvestre o los virus mutantes y se determinó la expresión de luciferasa (**Figura R12A**). El virus silvestre prácticamente no tiene efecto en la expresión de ISGs, mientras que la adición de IFN exógeno provoca una clara inducción del promotor ISRE. Todos los virus mutantes analizados inducen la expresión de luciferasa, especialmente los virus 11 y 12. Este ensayo de expresión de los genes ISGs, no sólo refleja la producción de IFN (**Figuras R5 y R11**), sino también la capacidad de cada virus para bloquear la expresión del promotor ISRE. Los datos

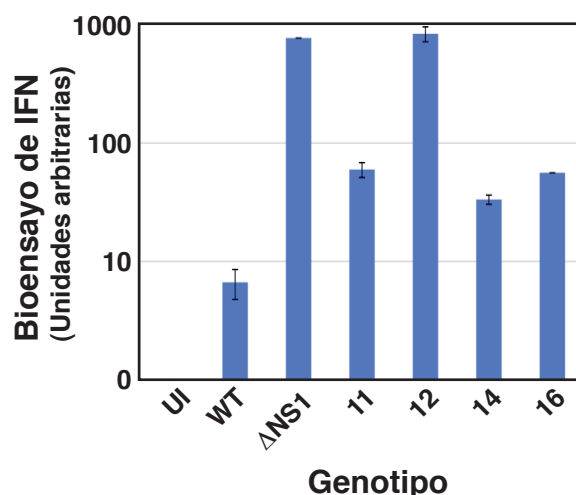


Figura R11. Secreción de factores antivirales durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes.

Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A las 24 horas post-infección se recogieron los sobrenadantes y se inactivaron con luz UV. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 de los sobrenadantes y se trataron monocapas de células A549-N^{Pro} con las distintas diluciones. Pasadas 24 horas del tratamiento, se infectaron con virus ECMV a baja mdi. Después de tres días se analizó la integridad de la monocapa por tinción con cristal violeta. La actividad de los sobrenadantes para interferir con la replicación del virus ECMV se calculó en unidades arbitrarias a partir del número de pocillos protegidos, usando como referencia una curva estándar de IFN- α .

mostrados en la **Figura 12A** hacen pensar que los virus 11 y 12 son incapaces de bloquear la respuesta producida por el IFN. Para verificar esta hipótesis se infectaron las células A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N^{Pro} con los diferentes virus a alta multiplicidad de infección. Además de luciferasa bajo el control del promotor ISRE, estas células expresan la proteína N^{Pro} del virus BVDV de forma constitutiva. Esta proteína viral degrada de forma selectiva el factor celular IRF3, impidiendo por tanto la expresión de IFN en la célula. En la **Figura R12B** se observa que ningún virus es capaz de inducir luciferasa en ausencia de IFN, como es esperable. Sin embargo, cuando se añade IFN exógeno las células que no han sido infectadas inducen la expresión de luciferasa. Esta inducción es bloqueada por la infección con el virus silvestre. Los virus mutantes presentan ciertas deficiencias en este bloqueo, parciales para los mutantes 14 y 16, y más acentuadas para los mutantes 11 y 12, tal como cabía esperar de los resultados anteriores.

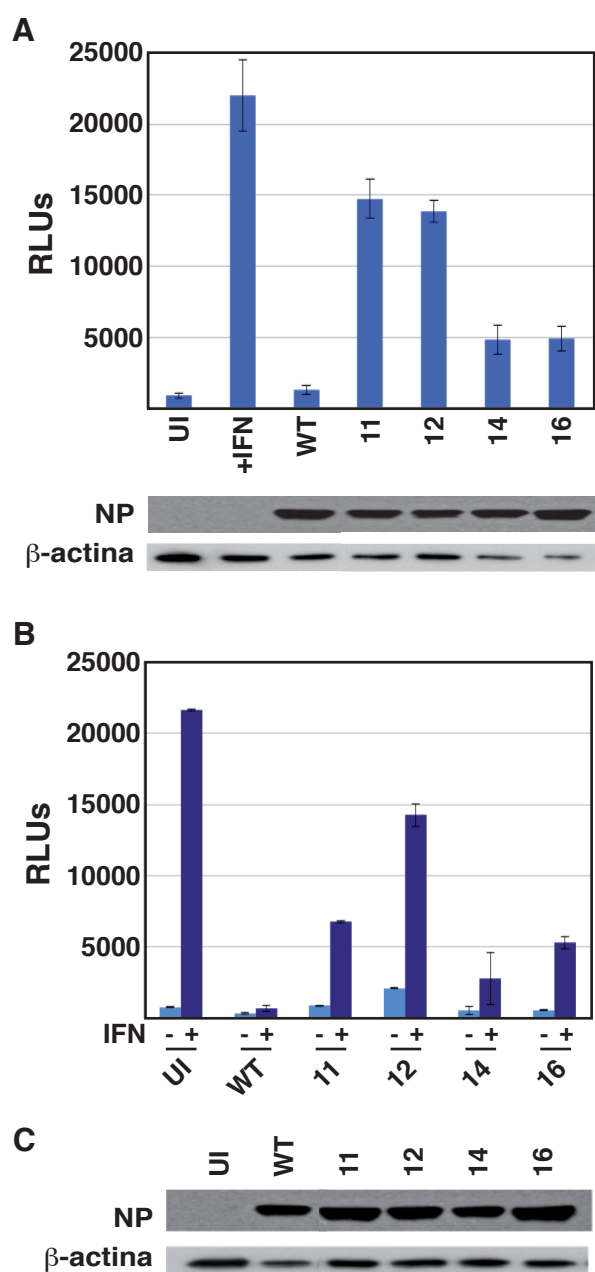


Figura R12. Inducción de Luciferasa bajo el promotor ISRE por infección con el virus Vic y los virus mutantes.

A) Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549/pr(ISRE).Luc a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic o con los diferentes mutantes seleccionados. A las 7 horas post-infección se añadió IFN- α en los casos indicados. Pasadas 13 horas desde el momento de la infección, se recogieron los extractos celulares y se determinó la expresión de luciferasa. Como control, también se analizó mediante *Western-blot* la acumulación de NP y β -actina usando anticuerpos específicos. **B)** Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N^{pro} a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic o con los diferentes mutantes seleccionados. A las 7 horas post-infección se añadió IFN- α en los casos indicados. Pasadas 13 horas desde el momento de la infección se recogieron los extractos celulares y se determinó la expresión de luciferasa. **C)** Los extractos celulares correspondientes a las muestras tratadas con IFN en el panel B se usaron también para medir la acumulación de NP y β -actina.

Con la intención de entender mejor el fenotipo de los mutantes en su relación con la respuesta IFN, se estudiaron una serie de factores claves para la expresión de IFN y la señalización celular. Para ello, se infectaron células A549 a alta multiplicidad con los diferentes mutantes y con el virus Vic silvestre y delNS1 como controles, y los extractos celulares se analizaron por *Western-blot*. Los resultados se muestran en la **Figura R13**. Todos los mutantes son capaces de inducir la fosforilación del factor IRF3. El mutante 12 presenta altos niveles de inducción, similares a los del virus delNS1, de acuerdo con los resultados de expresión de GFP y de actividad antiviral mostrados en las **Figura R5** y **R11**.

Tanto el mutante 12 como el virus delNS1 inducen fuertemente la expresión del factor ISG56, en consonancia con los datos publicados de inducción de ISG56 por el factor IRF3 (Moore *et al.*, 2011). A diferencia del virus Vic silvestre, el virus delNS1 y los virus mutantes inducen la expresión de MxA, de acuerdo con los experimentos de expresión de luciferasa descritos en la **Figura R12A**. De forma inesperada, el virus Vic, y en menor medida el mutante 11, inducen la expresión de MxB, pero este fenómeno no se ha analizado con mayor detalle. Además, se ha sugerido que la expresión de esta proteína no afecta la replicación del virus de la gripe (Jin *et al.*, 2001). Tal y como se ha descrito anteriormente (Hale & Randall, 2007; Hale *et al.*, 2006; Zhirnov & Klenk, 2007), la deficiencia de la proteína NS1 del virus delNS1 impide la activación de la vía Akt y permite la inducción de apoptosis, tal y como se muestra en la **Figura 13** por el procesamiento proteolítico de la caspasa 3. En comparación con el virus Vic silvestre, únicamente el mutante 12 presenta una reducción en el nivel de fosforilación de Akt y cierta inducción de apoptosis.

1.9. Rescate de mutaciones puntuales del segmento NS en virus infeccioso por el sistema de transfección de plásmidos

Para estudiar si el fenotipo descrito más arriba se debe exclusivamente a las mutaciones identificadas en la proteína NS1 se rescataron virus que portan las mutaciones más interesantes. Se seleccionaron las mutaciones E172K y I68T. La mutación E172K se encontró en el mutante 12,

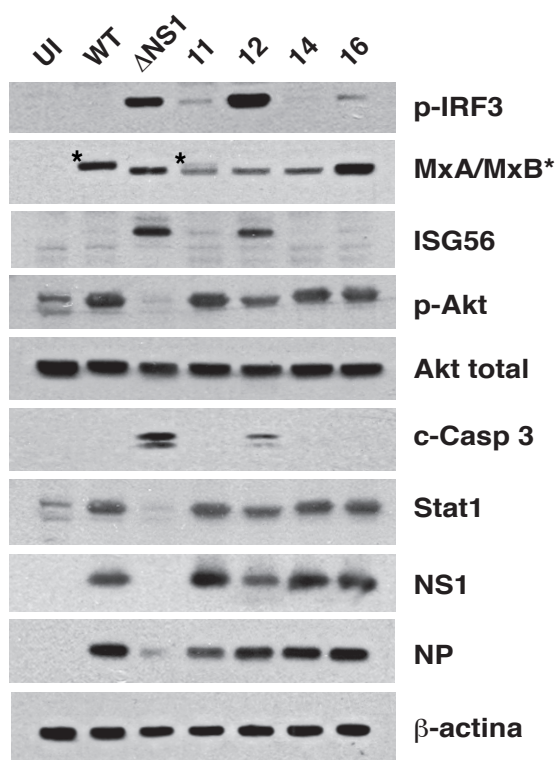


Figura R13. Análisis de la respuesta celular durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los virus mutantes.

Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes mutantes seleccionados. A las 16 horas post-infección se recogieron los extractos celulares y se analizaron los diferentes factores celulares y proteínas virales mediante *western-blot* con anticuerpos específicos.

cuyo fenotipo es muy similar al del virus delNS1 a pesar de presentar una única mutación puntual. La mutación I68T apareció en el mutante 16, y se escogió por su situación en el dominio de unión a RNA y por su posición en la estructura atómica de NS1. A pesar de su fenotipo se descartaron las mutaciones presentes en el mutante 11 porque 2 de las 3 mutaciones encontradas (I123V y S195P) habían sido descritas anteriormente (Garaigorta & Ortín, 2007; Min *et al.*, 2007). La mutación V23A del mutante 14 no se consideró interesante para su posterior estudio debido a la alta variabilidad de esta posición en los virus gripales.

Se rescataron virus que portaban las mutaciones indicadas de forma individual y un virus mutante doble con ambas mutaciones. Para ello se realizó una mutagénesis dirigida sobre el plásmido pHHNS1 tal y como se describe en el **apartado 1.2** de Materiales y Métodos, y se

procedió a rescatar virus mediante el sistema de transfección de plásmidos (**apartado 3.8** Materiales y Métodos). Durante la escritura de esta Tesis se está analizando el fenotipo de estos mutantes.

2. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES AFECTADOS EN EL BLOQUEO DE LA RESPUESTA INTERFERÓN MEDIANTE PASES SERIADOS

Como se ha indicado anteriormente, la proteína NS1 tiene un papel clave en el bloqueo de la respuesta IFN. En los últimos años se ha descrito que además de NS1, otros genes virales son capaces de alterar esta respuesta celular. La polimerasa viral inhibe la activación de IPS-1/MAVS, posiblemente mediada por la localización de PB2 en la mitocondria (Graef *et al.*, 2010; Iwai *et al.*, 2010). Además, PB1-F2 podría modular la respuesta IFN, aunque en la literatura se han descrito resultados contradictorios (Conenello *et al.*, 2011; Dudek *et al.*, 2011; Le Goffic *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011). Por este motivo, y como complemento a los resultados presentados en la primera parte de esta Tesis, nos planteamos determinar si otros genes virales tienen un papel

importante en la regulación de la respuesta IFN.

2.1. Generación de poblaciones mutantes mediante pases seriados

Con el objetivo final de responder a esta cuestión nos planteamos realizar una segunda estrategia para generar una colección de mutantes afectados en el bloqueo de la respuesta IFN. Para ello se realizaron pases seriados de un virus silvestre en células en las que el sistema IFN se encuentra interrumpido. Cabe esperar que al haber eliminado la presión selectiva se podrán acumular mutaciones en todos aquellos genes virales implicados en la regulación de este proceso.

A diferencia de la otra estrategia, en la que se realiza una mutagénesis al azar, en este caso no se fuerza o induce la aparición de mutaciones. Únicamente esperamos que se acumulen mutaciones que no afecten a otras funciones importantes del virus, o al *fitness* del mismo, ya

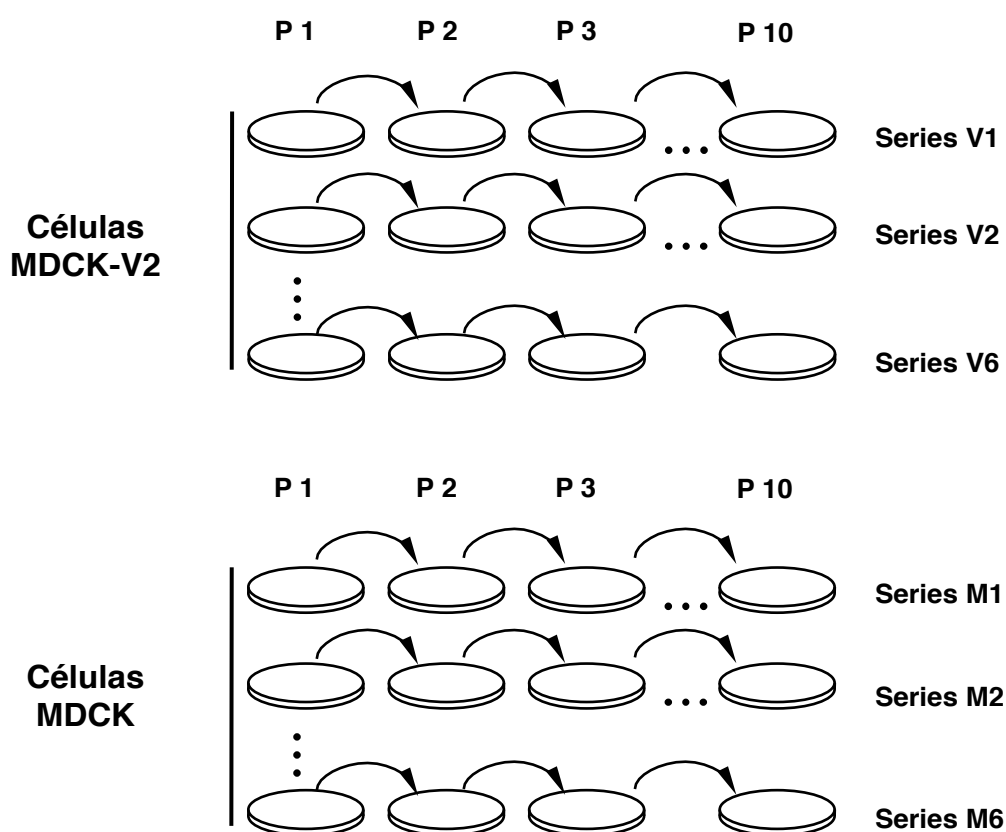


Figura R14. Representación esquemática de los pases realizados a partir del virus silvestre.

A partir del virus Vic silvestre (P0) se realizaron 10 pases consecutivos en células MDCK-V2 (series V1-V6) y 10 pases en células MDCK (series M1-M6). Ambos tipos de pases se realizaron a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) y en 6 series independientes para aumentar así la variabilidad de mutantes que se puedan generar.

que estas deberían desaparecer en los sucesivos ciclos de replicación.

Se utilizó un lote de virus Vic silvestre altamente homogéneo (Pase 0) para la realización de pases consecutivos sobre células MDCK-V2, que como se ha indicado anteriormente carecen del factor celular STAT1, clave para la respuesta celular a IFN (Precious *et al.*, 2005). Como control, se llevaron a cabo en paralelo los mismo pases en células MDCK. Para ello se infectaron monocapas de ambos tipos celulares a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con la intención de seleccionar virus que sean capaces de replicar eficientemente, y para disminuir la acumulación de posibles DIs (Von Magnus, 1951). Se realizaron un total de 10 pases consecutivos en seis series independientes para aumentar la variabilidad de mutantes que se puedan generar, ya que la aparición de mutaciones se debe a un proceso al azar. En la **Figura R14** se muestra la estrategia experimental realizada.

2.2. Caracterización de las poblaciones virales

Después de 10 pases seriados, se analizaron las poblaciones virales generadas. Estas deberían replicar de forma normal en células MDCK-V2, pero no en MDCK, mientras que los virus control no deberían presentar diferencias. Para testar esta hipótesis se realizaron cinéticas a baja multiplicidad de infección en ambos tipos celulares. Este ensayo permite evaluar la capacidad de crecimiento del virus en ciclos virales sucesivos. Para su realización, se infectaron monocapas de células MDCK y MDCK-V2 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con los distintos virus generados (series M1-M6 y series V1-V6), además de con el Pase 0 y el virus delNS1 como controles. A distintos tiempos post-infección se recogieron muestras de los sobrenadantes para analizar su infectividad en células permisivas MDCK-V2. En la **Figura R15** se muestran los datos obtenidos en este ensayo. El resultado se expresa como el valor de la relación del título obtenido en la cinética realizada en células MDCK-V2 y el de la cinética en MDCK. El virus paterno produce títulos similares en ambos tipos celulares, mientras que el virus delNS1 replica aproximadamente 50 veces mejor en las células MDCK-V2 que en células MDCK. Las poblaciones seleccionadas después de pases seriados en células MDCK (series M1-M6) presentan un diferencia de título en ambas

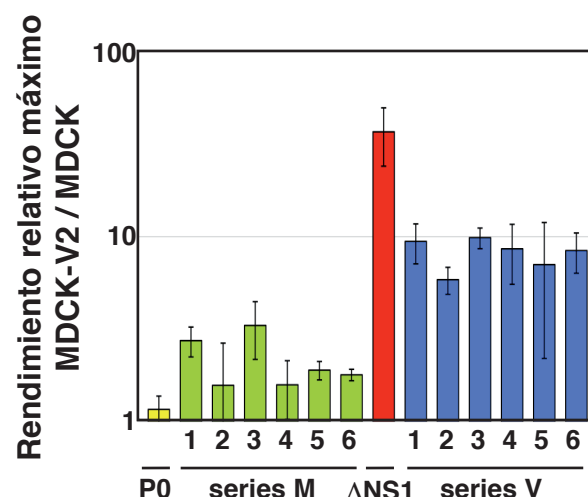


Figura R15. Rendimiento relativo máximo de las poblaciones generadas en células MDCK o MDCK-V2. Se infectaron células MDCK o MDCK-V2 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con las diferentes poblaciones generadas en células MDCK-V2 (series V1-V6) o en células MDCK (series M1-M6). Además se incluye el Pase 0 (P0) y el virus delNS1 como control. A diferentes tiempos post-infección se recogieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa en células permisivas MDCK-V2. En la gráfica se representa el título relativo máximo en células MDCK-V2 respecto al obtenido en células MDCK. Los datos corresponden a un triplicado de infección.

células de aproximadamente 2 veces. Sin embargo, los virus pasados en células MDCK-V2 (series V1-V6) replican significativamente mejor en células MDCK-V2 que en células MDCK (hasta 10 veces de diferencia). Estos datos sugieren que estas poblaciones contienen virus individuales que no pueden crecer de forma eficiente en células con un sistema IFN activo (células MDCK). Para confirmar esto, algunas de las poblaciones generadas en células MDCK y MDCK-V2 se usaron en un experimento similar al anterior, pero infectando células MDCK-V5. Estas células expresan la proteína V del virus Parainfluenza de tipo 5 (PIV5) que también bloquea la cascada de señalización de IFN (Precious *et al.*, 2005). En la **Figura R16** se muestran los resultados obtenidos. Estos son muy similares a los mostrados anteriormente para las células MDCK-V2 (**Figura R15**), lo que sugiere que las diferencias de replicación de las poblaciones virales V1-V6 no se deben a un proceso de adaptación general a un nuevo tipo celular, sino a la acumulación de mutaciones como consecuencia de haber eliminado la presión selectiva.

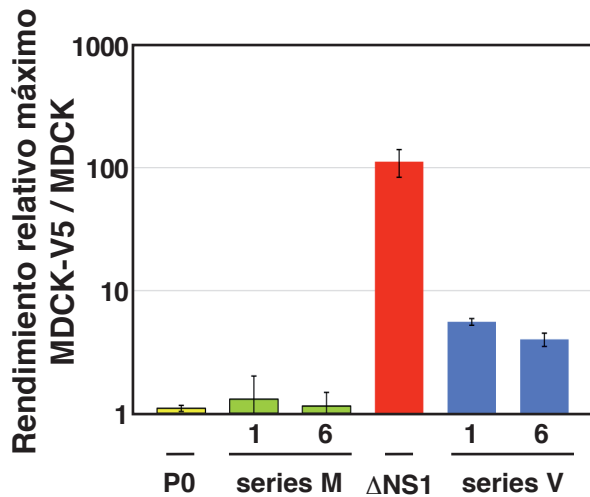


Figura R16. Rendimiento relativo máximo de las poblaciones generadas en células MDCK o MDCK-V5.

Se infectaron células MDCK o MDCK-V5 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con algunas de las poblaciones generadas en células MDCK-V2 (series V1 y V6) o en células MDCK (series M1 y M6). Además se incluye el Pase 0 (PO) y el virus delNS1 como control. A diferentes tiempos post-infección se recogieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa en células permisivas MDCK-V2. En la gráfica se representa el título relativo máximo en células MDCK-V5 respecto al obtenido en células MDCK. Los datos corresponden a un triplicado de infección.

El fenotipo de las poblaciones pasadas puede deberse a la presencia de muchas mutaciones que afecten a varios genes, o a un pequeño número de mutaciones concentradas en un único gen,

por ejemplo NS1. Para resolver esta cuestión, se secuenció el genoma de cada población mediante ultrasecuenciación. No se encontraron cambios entre las secuencias consenso de las poblaciones pasadas en células MDCK-V2 y las pasadas en células MDCK. Estos datos sugieren que la primera opción es la más probable, y que las mutaciones se encuentran muy repartidas en el genoma y en la población.

2.3. Selección de poblaciones virales mutantes mediante *cell sorter*

Para aislar de las poblaciones virus mutantes potencialmente afectados en el bloqueo de la respuesta IFN se procedió de forma similar a lo realizado anteriormente con las genotecas de virus mutantes en NS. Se infectaron células A549/pr(IFN- β).GFP con cada una de las poblaciones V1-V6 generadas en células MDCK-V2, o bien con la población M1 como control. Las infecciones se llevaron a cabo a baja mdi (0,04 ufp/célula) para disminuir la probabilidad de que una célula resulte infectada por dos virus a la vez o por potenciales DIs. A las 8 horas de infección, se seleccionaron aquellas células que expresaban GFP mediante *cell-sorter*.

A partir de las células seleccionadas que expresaban GFP se siguieron dos estrategias diferentes. Se sembraron de forma conjunta entre 1000 y 9000 células positivas sobre cultivos de células MDCK-V2 con la intención de rescatar una población de virus progenie a partir

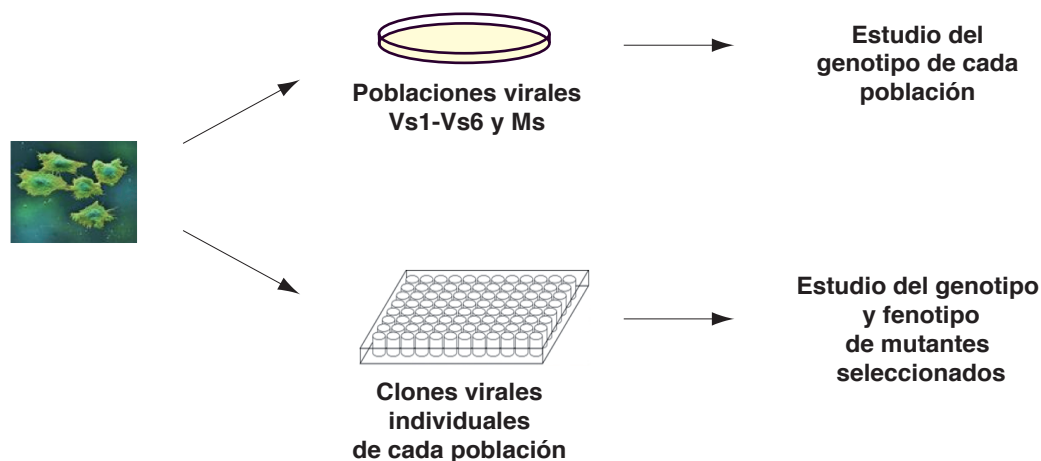


Figura R17. Representación esquemática de las estrategias usadas con las células positivas provenientes del *cell-sorter*.

Con las células positivas seleccionadas mediante *cell-sorter* se siguieron dos estrategias diferentes. En la primera se sembraron de forma conjunta entre 1000 y 9000 células positivas sobre cultivos de células MDCK-V2 para rescatar una población de virus progenie, y se estudió el genotipo de cada población. Alternativamente, células positivas individuales se sembraron sobre microcultivos de células MDCK-V2 con la intención de aislar clones individuales de virus.

de las células seleccionadas de cada población. Alternativamente, células positivas individuales se sembraron sobre microcultivos de células MDCK-V2 con la intención de aislar clones individuales de virus. El esquema de la **Figura R17** resume ambas estrategias.

2.4. Análisis genotípico de las poblaciones seleccionadas

Con el objetivo de estudiar el genotipo de las poblaciones seleccionadas, se aisló RNA a partir de viriones purificados de cada una de ellas, y se analizó por ultrasecuenciación usando la técnica de Solexa Illumina, que permite secuenciar moléculas individuales. En total se obtuvieron alrededor de 4 millones de secuencias cortas de cada muestra que se alinearon contra la secuencia del virus Vic silvestre (secuencia de referencia) usando herramientas bioinformáticas. De esta forma, se obtuvo la secuencia consenso de cada población, y también se pudo observar la complejidad de la cuasiespecie con una media de entre 2.800 y 12.000 lecturas por nucleótido. No se encontraron cambios relevantes en la secuencia consenso de ninguna de las poblaciones. Cabe esperar que aquellas posiciones del genoma potencialmente importantes para el bloqueo de la respuesta IFN deberían presentar un aumento de la variabilidad, aunque ésta no haya resultado lo suficientemente alta como para producir cambios en la secuencia consenso. La variabilidad media por posición del genoma en todas las poblaciones analizadas fue del 0,35%. Teniendo esto en cuenta, se eligió el valor del 5%, más de 10 veces superior a la media, como límite para identificar potenciales cambios de nucleótido presentes en las poblaciones seleccionadas. Siguiendo este criterio, se encontraron 41 posiciones del genoma con una alta variabilidad en las poblaciones seleccionadas Vs1-Vs6, que sin embargo no eran particularmente variables en la población seleccionada control Ms (**Tabla R2**). Sorprendentemente, las 41 posiciones variables se distribuyen en todos los segmentos de gripe excepto NP y conforman un mapa de mutaciones potenciales asociadas con un fenotipo de activación de la respuesta IFN o de incapacidad de bloqueo de la misma.

Entre las posiciones consideradas variables, 11 de ellas muestran también una alta variabilidad en alguna otra de las poblaciones

seleccionadas (series Vs1-Vs6) (**Tabla R2**). Esto sugiere que han mutado independientemente durante los pases seriados y por tanto, podrían representar posiciones relevantes para el bloqueo de la respuesta IFN. Además, en 24 de las posiciones se originarían 25 cambios de aminoácido (celdas en verde, **Tabla R2**). Si se comparan los cambios detectados en esas 41 posiciones variables con las bases de datos de secuencias de gripe, la frecuencia de aparición de muchos de los cambios sinónimos es muy alta (13 de 17; **Tabla R2**). Sin embargo, la mayoría de las posiciones que originarían cambios de aminoácido se encuentran en posiciones muy conservadas (18 de 25; **Tabla R2**). Esta observación sugiere que muchas de las mutaciones sinónimas podrían ser resultado de deriva génica, mientras que los cambios no sinónimos podrían haber sido seleccionados positivamente. Debido a que se trata de un análisis a nivel de población, no es posible conocer si las mutaciones sinónimas se han podido co-seleccionar a lo largo de los pases seriados con aquellas que suponen un cambio de aminoácido. En la **Tabla R3** se detallan únicamente aquellas posiciones que originan un cambio de aminoácido.

2.5. Análisis fenotípico de los mutantes individuales seleccionados

Como se ha indicado anteriormente, se siguieron dos estrategias con las células positivas seleccionadas por *cell-sorter*. En la segunda de ellas, las células aisladas se sembraron de forma individual sobre microcultivos de células MDCK-V2 con la intención de obtener clones de virus. De un total de 1200 microcultivos, 109 mostraron signos claros de infección y se procedió a recoger los sobrenadantes correspondientes. Se volvieron a infectar células A549/pr(IFN- β). GFP para comprobar de nuevo la inducción de GFP. Alrededor del 75% de los virus mostraron niveles de inducción superiores al del virus silvestre. Después de un análisis preliminar del fenotipo, 6 de esos virus se seleccionaron para ser analizados con mayor detalle. En la **Figura R18** se muestran los resultados de inducción de GFP en infecciones a alta mdi para estos 6 virus, que en concordancia con el sistema de selección utilizado presentan niveles de inducción superiores al del virus silvestre.

Tabla R2. Resumen de las mutaciones encontradas en las poblaciones

RNA	POSICIÓN	CAMBIO NT	CAMBIO AA	Ms _s	Vs1	Vs2	Vs3	Vs4	Vs5	Vs6	F.Ap #
PB2	580	A-G	SI	0.00		13.26					C
	1554	G-A	NO	0.10				7.39			V
	2057	A-C	SI	0.08		15.74		5.61			C
	2105	G-A	SI	0.19	7.56						C
PB1	180	A-G	SI	0.25		5.14					V
	726	T-C	NO	1.10		9.80					V
	1855	T-C	NO	0.27		6.71					V
	2112	C-A	SI	0.09		5.45					C
	2113	G-A	SI	0.09		6.23					C
	2280	A-G	NO	0.79				6.29			V
PA	75	A-G	NO	0.16				16.47			V
	986	A-G	SI	2.32					11.14		POCO V
	1515	A-G	NO	0.25						36.81*	V
	1560	G-A	NO	0.09					6.25		V
	1789	C-A	SI	0.09						7.11	C
	1809	G-A	SI	0.11	5.42						C
HA	34	A-G	SI	0.59		7.32					POCO V
	975	A-C	SI	0.56						46.72	C
	991	C-A	SI	0.18		14.46					POCO V
	1241	G-A	NO	2.57	18.73	26.39	18.54		20.40		V
	1466	G-A	SI	0.22					9.35		C
	1734	G-A	NO	0.00						41.82	C
NA	168	T-C	SI	1.08			11.63		12.31	8.38	V
	186	T-C	SI	0.19			12.24		12.33	8.57	V
	220	T-C	NO	0.64			16.00		13.73	9.87	C
	221	T-C	NO	0.40			15.88		13.33	9.98	V
	226	T-C	NO	0.25			17.94		15.00	11.42	V
	367	G-A	NO	0.03	5.95						POCO V
	1381	G-A	NO	0.07	16.22						V
	147	C-T	SI	0.41	8.53			35.16	12.19	35.94*	V
	309	G-A	SI	0.33	46.43*						V
M	370	A-G	SI	0.27						6.64	C
	441	C-T	SI	0.18			27.17				C
	535	T-C	NO	0.25		9.38	20.92		11.78		C
	696	G-A	SI	0.14					11.82		V
	866	C-T	NO	0.26			21.10				V
	176	C-T	NO	0.00					9.41		V
NS	253	C-A	SI	0.08						6.53	POCO V
	459	A-G	SI	0.09		9.33		7.68			V
	540	G-A	SI	1.07			10.90	12.68			C
	553	A-T	SI	0.20	9.50						C

Tabla R2 y R3:

Ms_s: variabilidad media por posición del genoma en la población control M1 después de ser seleccionada por cell-sorter; **Vs1-Vs6**: variabilidad media por posición para cada una de las poblaciones problema (V1-V6) después de ser seleccionadas por cell-sorter; **F.Ap #**: Frecuencia de aparición de las mutaciones en las bases de datos de secuencias de gripe (**C**: posición conservada; **POCO V**: Posición poco variable; **V**: posición variable). En verde se reflejan aquellas posiciones que originarían cambio de aminoácido. En azul oscuro aquellas posiciones conservadas en las bases de datos de secuencias de gripe, y en azul claro las poco variables.

Tabla R3. Resumen de los cambios de aminoácido encontrados en las poblaciones

PROTEÍNA	POSICIÓN	CAMBIO NT	CAMBIO AA	Ms _s	Vs1	Vs2	Vs3	Vs4	Vs5	Vs6	FAp #
PB2	580	A-G	I185V	0		13.3					C 4/6100
	2057	A-C	E677A	0.1		15.7		5.6			C 3/6100
	2105	G-A	G693E	0.2	7.6						C 1/6100
PB1-F2	180	A-G	K21R	0.2		5.1					V
PB1	2112	C-A	F696L	0.1		5.4					C 0/6199
	2113	G-A	E697K	0.1		6.2					C 0/6199
PA	986	A-G	Y321C	2.3					11.1		POCO V 21/5502
	1789	C-A	L589I	0.1						7.1	C 2/5502
	1809	G-A	M595I	0.1	5.4						C 5/5502
HA	34	A-G	K2R	0.6		7.3					POCO V 23/3226
	975	A-C	K316Q	0.6					46.7		C 0/3226
	991	C-A	A321E	0.2		14.5					POCO V 0/3226
	1466	G-A	M479I	0.2					9.4		C 7/3226
NA	168	T-C	V50A	1.1			11.63		12.3	8.4	V 32/4312
	186	T-C	I56T	0.2			12.24		12.3	8.6	V
M1	147	C-T	A41V	0.4	8.5			35.1	12.2	35.9*	V
	309	G-A	R95K	0.3	46.4*						V
	370	A-G	I115M	0.3						6.6	C 0/6607
	441	C-T	T139I	0.2			27.17				C 0/6607
	696	G-A	S224N	0.1					11.8		V
NS1	253	C-A	A76E	0.1						6.5	POCO V 1/6226
	459	A-G	I145V	0.1		9.3		7.6			V
	540	G-A	E172K	1.1			10.9	12.7			C 3/6226
NS2	553	A-T	N176I	0.2	9.5						C 7/6226
	553	A-T	M19L	0.2	9.5						C 9/5988

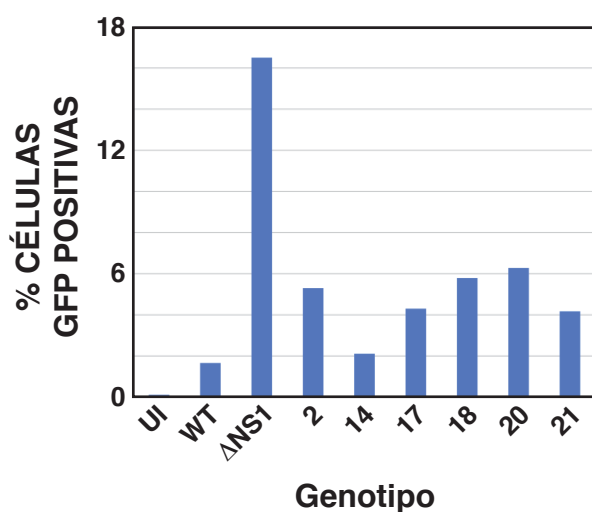


Figura R18. Inducción de GFP bajo el promotor de IFN del virus Vic, delNS1, y de los clones mutantes seleccionados.

Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549/pr(IFN-β).GFP con los virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados a md de 5 ufp/célula. Después de 10 horas de infección se recogieron las células y se midió la expresión de GFP mediante citometría de flujo. En cada caso se analizaron 10.000 células.

2.5.1. Análisis de la capacidad de replicación de los virus mutantes seleccionados

Posteriormente, se procedió a analizar la eficiencia de replicación de dichos mutantes. Se realizaron cinéticas a baja multiplicidad de infección en células normales o en células deficientes en la respuesta IFN (**Figura R19**). Tal como cabía esperar, los títulos obtenidos son superiores en células permisivas, aunque todos los virus son capaces de replicar eficazmente en ambos tipos celulares. El mutante 2 muestra una reducción de título de aproximadamente 10 veces en células MDCK, y los mutantes 18, 20 y 21 presentan pequeñas, aunque significativas reducciones. Los mutantes 14 y 17 no presentan diferencias importantes en el título final alcanzado, aunque la cinética del mutante 14 presenta un claro retraso en células MDCK. En la **Figura R20** se representa la relación de título máximo en ambos tipos celulares. Estos datos reflejan de forma clara los resultados anteriores. Ambos datos se verificaron en estudios de comparación del tamaño de placa en células MDCK *versus* células MDCK-V2 (**Figura R21**). Únicamente el mutante 2 muestra una clara reducción del

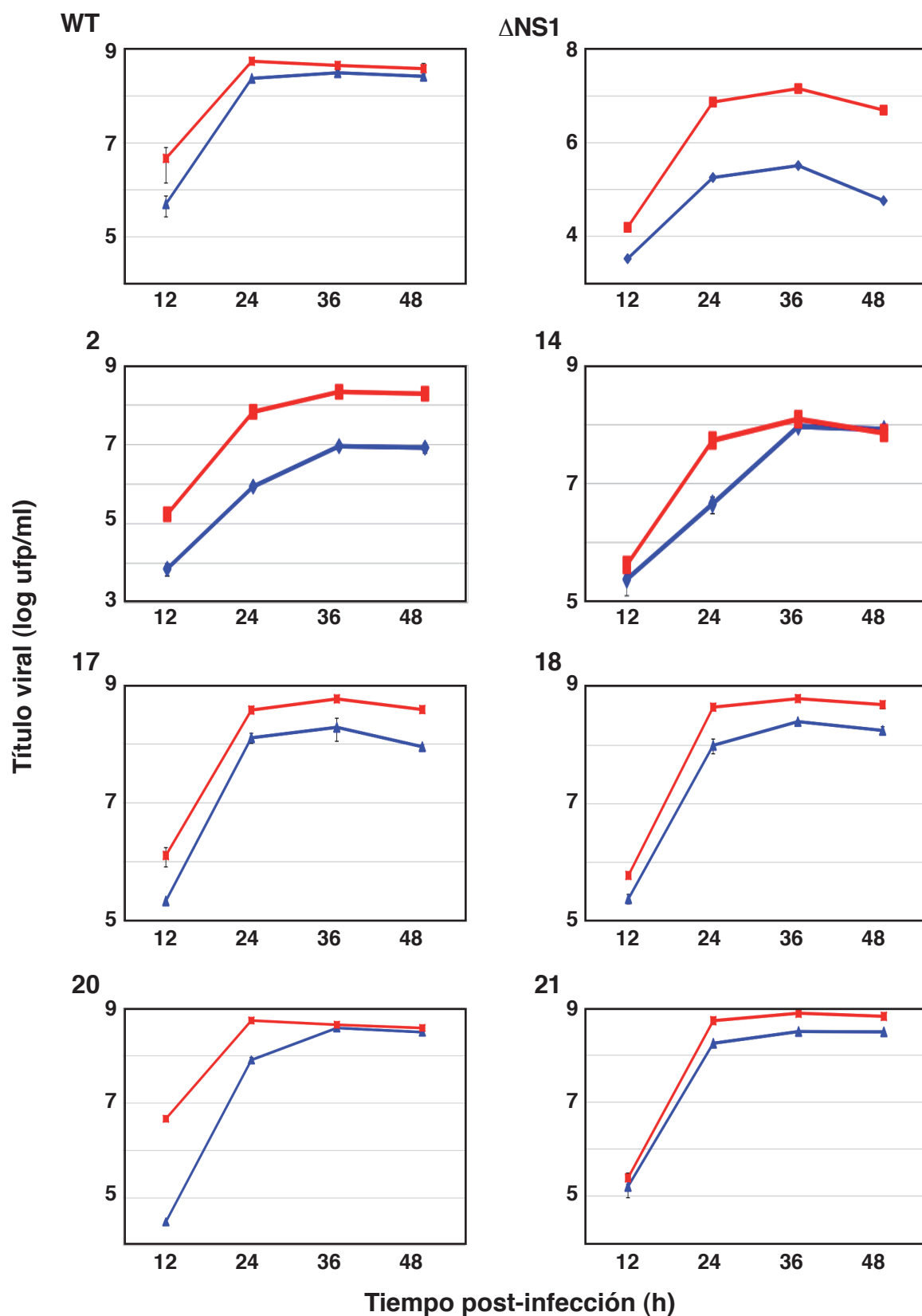


Figura R19. Cinética de crecimiento del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes en células MDCK o MDCK-V2.

Se infectaron células MDCK o MDCK-V2 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se recogieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa en células permisivas MDCK-V2. Los datos corresponden a un triplicado de infección.

tamaño de placa en células MDCK, comparable a la del virus del NS1.

Para analizar si los virus aislados presentan defectos en el ciclo de infección viral, se realizaron cinéticas a alta multiplicidad de infección en células A549 y se determinó la acumulación de las proteínas NP, NS1 y M a diferentes tiempos post-infección (**Figura R22**). Todos los virus presentan cinéticas normales, aunque los mutantes 2 y 20 muestran un ligero retraso respecto al virus silvestre.

Se quiso estudiar también el desarrollo de la infección y la localización de las proteínas en la célula en el transcurso de la misma. Para ello se infectaron a alta mdi células A549 y se analizó la localización de las proteínas NP y NS1 a diferentes tiempos post-infección mediante inmunofluorescencia (**Figuras R23 y R24**). No se observaron alteraciones importantes para ninguno de los virus analizados. La localización era normal en todos los casos, aunque en el mutante 2 se muestra un cierto retraso. Estos resultados son consistentes con las cinéticas de

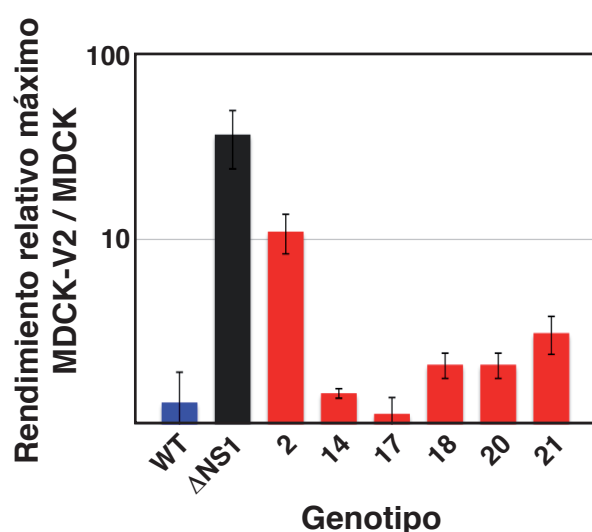


Figura R20. Rendimiento relativo máximo del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes en células MDCK o MDCK-V2.

Se infectaron células MDCK o MDCK-V2 a baja mdi (10^{-3} ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se recogieron muestras de cada sobrenadante y se determinó la infectividad de cada una de ellas mediante ensayo de placa en células permisivas MDCK-V2. En la gráfica se representa el título relativo máximo en células MDCK-V2 respecto al obtenido en células MDCK. Los datos corresponden a un triplicado de infección.

replicación normales observadas anteriormente y confirman que los mutantes seleccionados no presentan defectos importantes en replicación en células no permisivas.

2.5.2. Análisis de la interacción de los

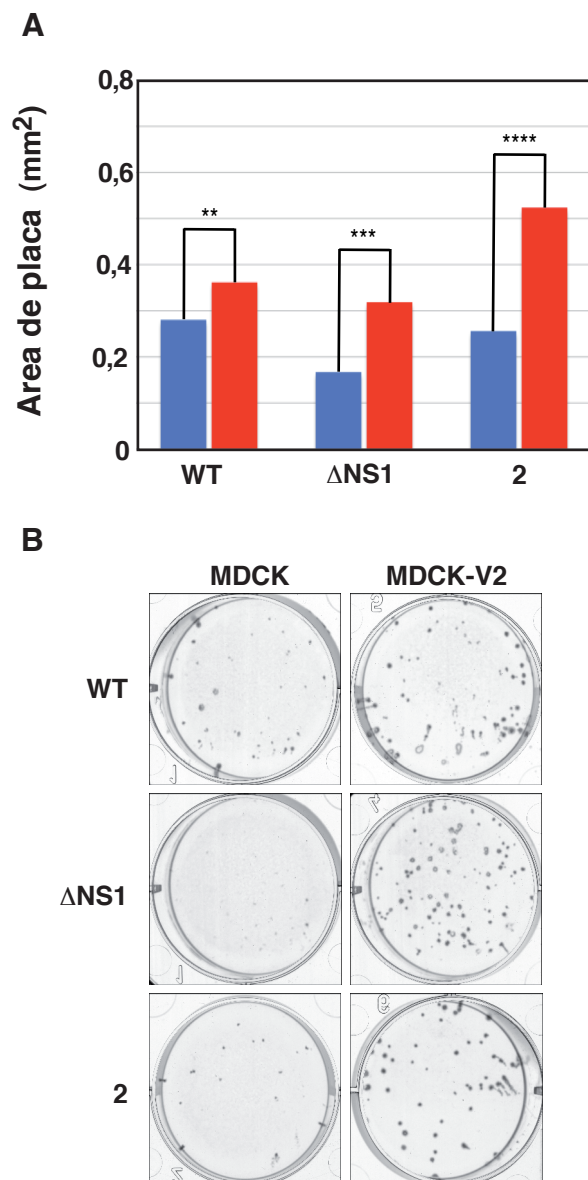


Figura R21. Estudio comparativo de tamaño de placa de lisis en células MDCK versus MDCK-V2.

Se realizaron ensayos de placa en paralelo en células MDCK y en células permisivas MDCK-V2. En la figura se representan los datos obtenidos con los virus Vic, delNS1 y el mutante 2. **A)** Gráfica que representa el tamaño de placa en mm². El número de placas medidas en cada tipo celular fue 176 (wt), 229 (delNS1) y 116 (mutante 2). ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001; **** p-value < 0.0001. **B)** Fotografía en las que se pueden ver las placas generadas por los distintos virus en ambos tipos celulares.

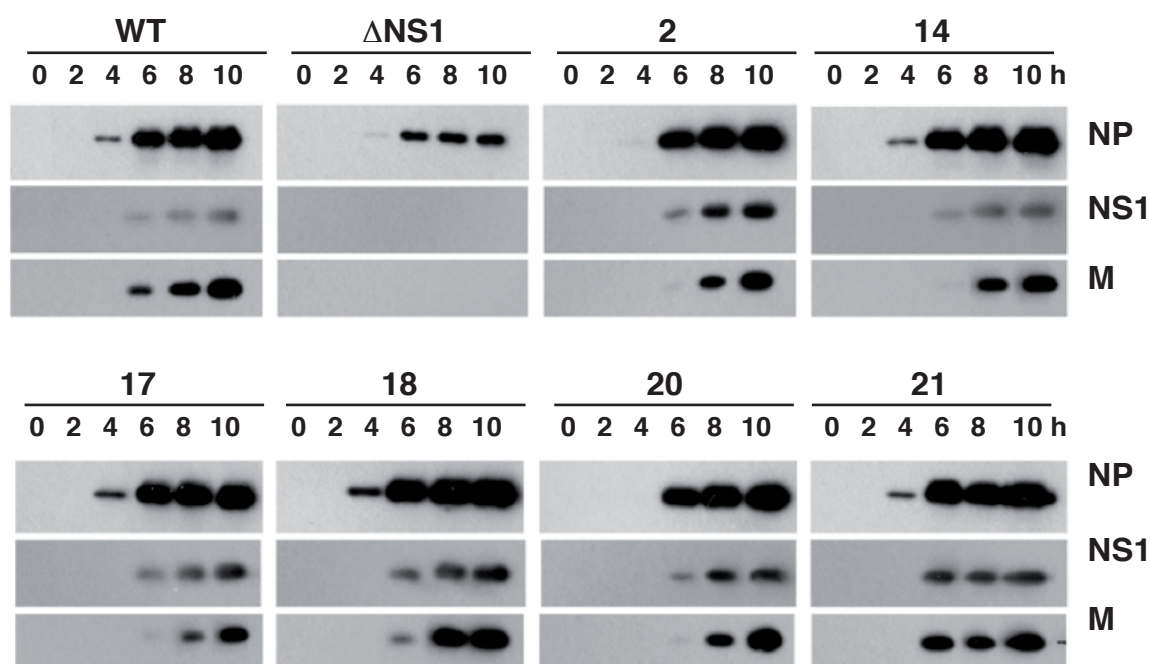


Figura R22. Cinética de acumulación de proteínas virales del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes seleccionados. Se infectaron células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se recogieron los extractos celulares y se analizó la acumulación de distintas proteínas virales (NP, NS1 y M) mediante *western-blot* con anticuerpos específicos. Los tiempos se indican en horas en la parte superior de los paneles.

virus seleccionados con el sistema inmune innato celular

A continuación se quiso estudiar la relación de los clones seleccionados con el sistema inmune innato celular. Teniendo en cuenta el método de selección usado para identificar estos virus, cabe esperar que induzcan una fuerte respuesta IFN en la célula infectada. De forma similar a lo realizado anteriormente, se analizó la capacidad de los sobrenadantes de células infectadas de bloquear la replicación del virus ECMV. Para ello, se infectaron células A549 a alta mdi con los virus mutantes y con el virus Vic silvestre y delNS1 como controles. Después de 24 horas se recogieron los sobrenadantes y se midió su capacidad para bloquear la replicación del virus ECMV, usando como curva estándar la actividad obtenida con diluciones seriadas de INF- α . En la **Figura R25** se muestran los resultados obtenidos como unidades arbitrarias. Todos los mutantes secretan factores antivirales a niveles entre 10 y 50 veces superiores a los del virus silvestre, aunque inferiores a los del virus delNS1. Estos datos correlacionan con la expresión de GFP obtenida en los experimentos mostrados

anteriormente (**Figura R18**).

Para estudiar la capacidad de inducción de la expresión de genes con capacidad antiviral o ISGs se infectaron células A549/pr(ISRE).Luc a alta mdi con el virus Vic silvestre o los virus mutantes y se determinó la expresión de luciferasa (**Figura R26A**). El virus silvestre prácticamente no tiene efecto en la expresión de ISGs, mientras que la adición de IFN exógeno provoca una clara inducción del promotor ISRE. Todos los virus mutantes analizados inducen la expresión de luciferasa, especialmente el mutante 20. Como se ha indicado anteriormente, este ensayo refleja tanto la producción de IFN, como la capacidad de cada virus para bloquear la expresión del promotor ISRE. Para analizar de forma aislada la capacidad de bloqueo se infectaron células A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N^{Pro} con los diferentes virus a alta mdi (**Figura R26B**). Como es esperable, ningún virus es capaz de inducir luciferasa en ausencia de IFN, pero al añadir IFN exógeno las células que no han sido infectadas inducen la expresión de luciferasa. El virus silvestre por el contrario es capaz de bloquear esta inducción, pero

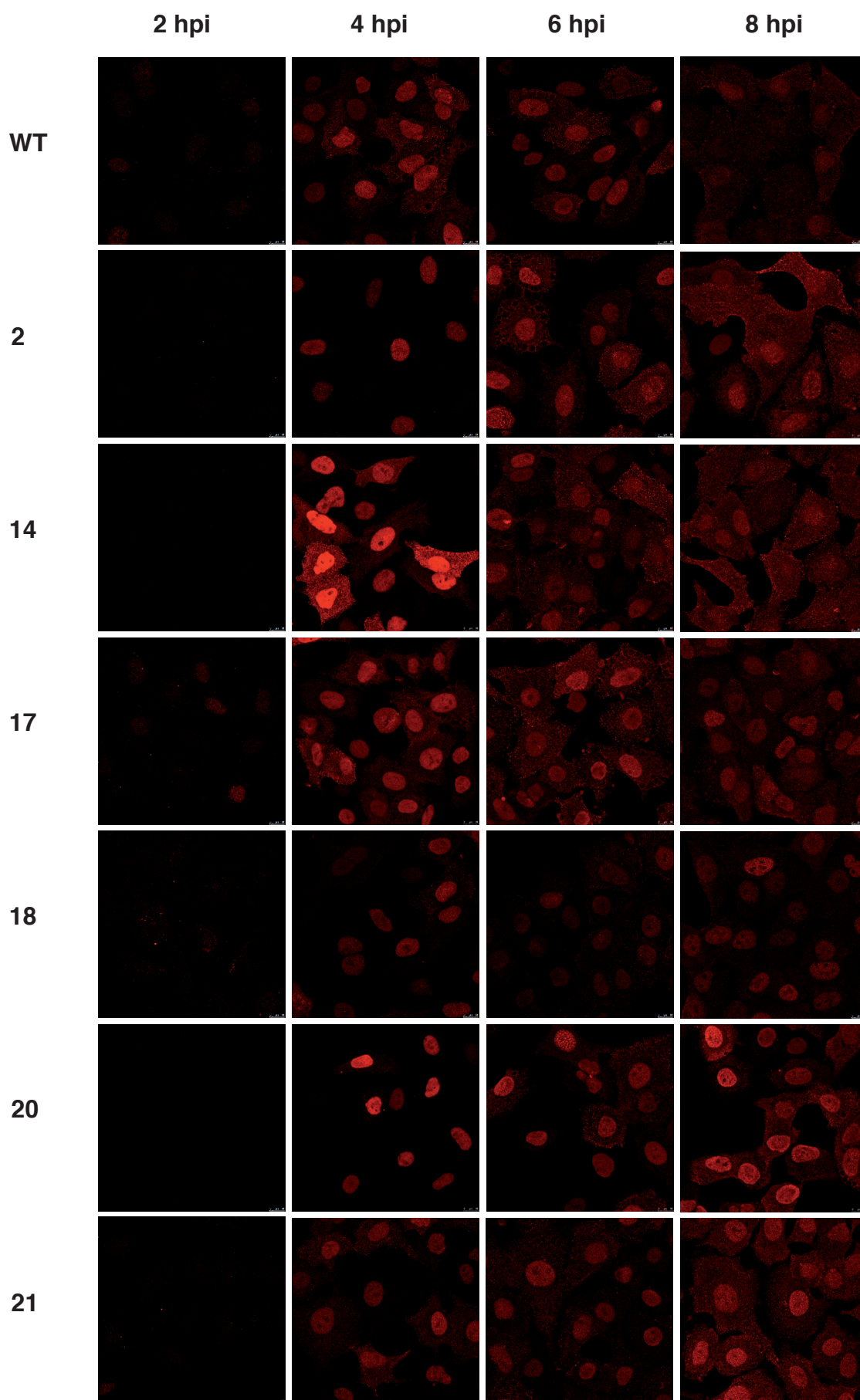


Figura R23. Cinética de localización de las RNPs durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes seleccionados. Se infectaron células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se fijaron las células y se realizó un marcaje con anticuerpos específicos de la proteína NP como marcador de RNPs.

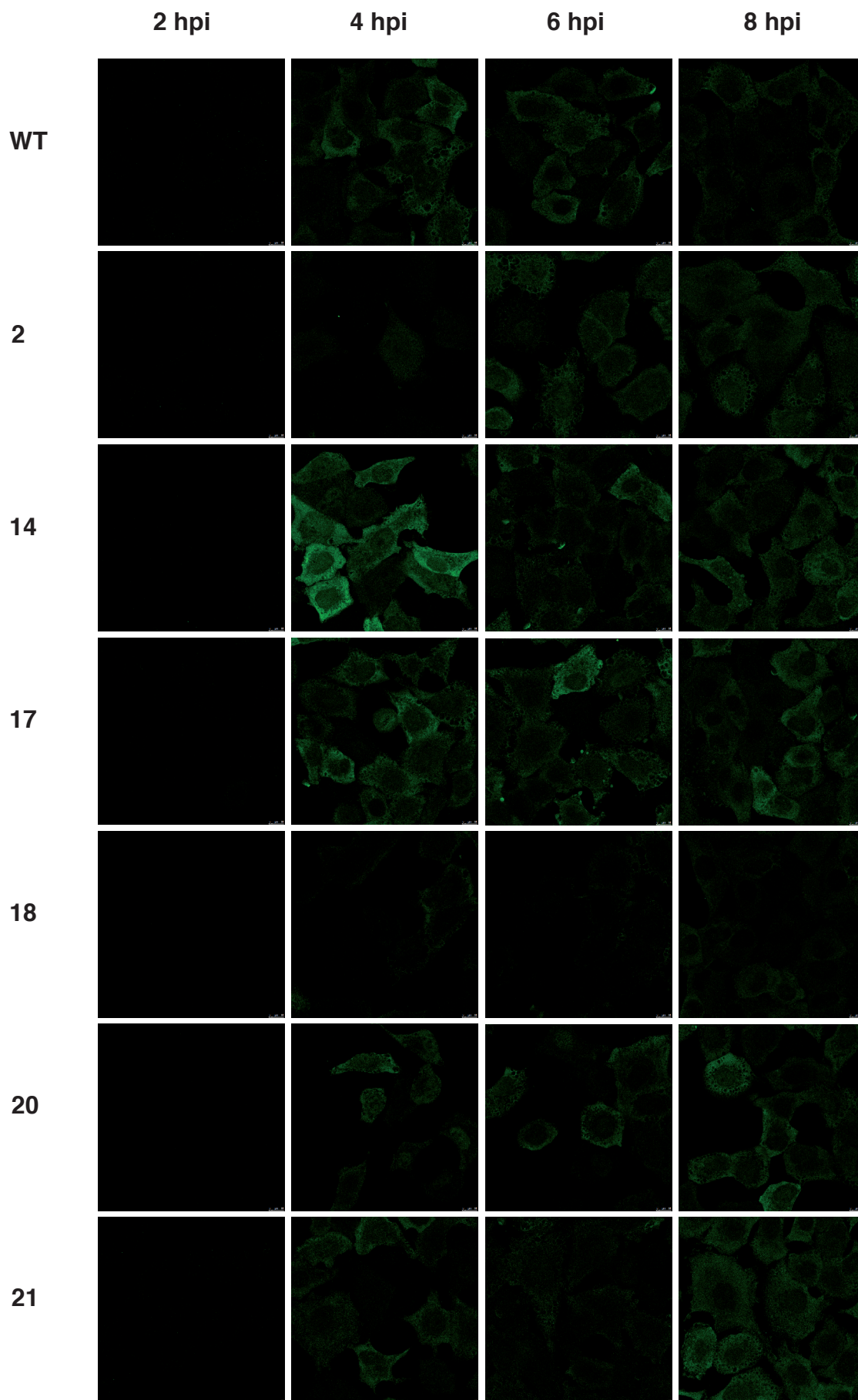


Figura R24. Cinética de localización de NS1 durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes seleccionados. Se infectaron células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A diferentes tiempos post-infección se fijaron las células y se realizó un marcaje con anticuerpos específicos de la proteína NS1.

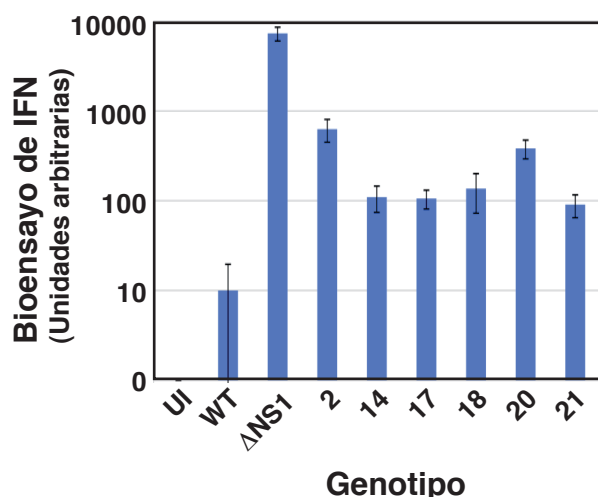


Figura R25. Secreción de factores antivirales durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes seleccionados.

Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A las 24 horas post-infección se recogieron los sobrenadantes y se inactivaron con luz UV. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 de los sobrenadantes y se trataron monocapas de células A549-N^{Pro} con las distintas diluciones. Pasadas 24 horas del tratamiento, se infectaron con virus ECMV a baja mdi. Después de tres días se analizó la integridad de la monocapa por tinción con cristal violeta. La actividad de los sobrenadantes para interferir con la replicación del virus ECMV se calculó en unidades arbitrarias a partir del número de pocillos protegidos, usando como referencia una curva estándar de IFN- α .

los virus 2, 14, 20 y 21 muestran defectos en este bloqueo, con niveles intermedios de inducción.

Con la intención de entender mejor el fenotipo de los mutantes y obtener una visión más amplia, se estudiaron una serie de factores claves en la respuesta IFN y la señalización celular. Para ello, se infectaron células A549 a alta multiplicidad con los diferentes mutantes y los extractos celulares se analizaron por *Western-blot*. Como control se usaron el virus Vic silvestre y el virus delNS1. Los resultados mostrados en la **Figura R27** revelan que los diferentes mutantes se pueden agrupar en 3 tipos de acuerdo con el fenotipo mostrado. La infección con el mutante 2 provoca una respuesta muy similar a la del virus delNS1. Una fuerte activación de IRF3 (p-IRF3), fosforilación de eIF2 α y activación parcial de apoptosis. Además, la infección con el mutante 2 provoca una inducción de la expresión de

MxA que no se observa con el virus delNS1, probablemente, como consecuencia de la fuerte inducción de apoptosis por este virus, y la consecuente degradación del factor STAT1. Por otro lado, los mutantes 20 y 21 presentan un fenotipo similar. La infección con dichos virus conlleva una activación parcial de IRF3, una fuerte inducción de la expresión de ISGs (MxA y ISG56) y activación de la vía Akt, pero ninguno de estos mutantes inducen apoptosis. Por último, los mutantes 14, 17 y 18 no muestran un fenotipo claro, excepto por la fuerte activación de la vía Akt por el mutante 14.

2.6. Análisis genotípico de los mutantes seleccionados

Para identificar las mutaciones que aparecen en los diferentes clones seleccionados y que podrían ser responsables del fenotipo estudiado, se secuenció el genoma completo a partir del RNA de viriones purificados mediante ultrasecuenciación usando la técnica de Solexa Illumina. En esta ocasión se llevó a cabo el protocolo *Paired-End* 2x50, que permite secuenciar los dos extremos de cada fragmento y relacionarlos *a posteriori*. En total se obtuvieron más de 20 millones de secuencias cortas de cada muestra. Mediante herramientas bioinformáticas se alinearon contra la secuencia del virus Vic silvestre (secuencia de referencia). Se obtuvo la secuencia consenso de cada mutante con una media de entre 20.000 y 60.000 lecturas por nucleótido. Las mutaciones observadas se detallan en la **Tabla R4**. Los cambios de nucleótido que aparecen en la secuencia consenso cuando se compara con la secuencia del virus inicial se muestran en rojo. En azul se muestran los cambios de nucleótido que aunque aparecen en un alto porcentaje de las secuencias (superior al 30%), no llegan a alterar la secuencia consenso. En todos los casos se indica la proporción del nucleótido alternativo (% NT alternativo). Además, como referencia se muestra la variabilidad encontrada en esa misma posición en el lote de virus original (% variación en Mi) y en el virus derivado de la población control después del *cell-sorter* (% variación en Ms). Algunas de las posiciones son altamente variables en las poblaciones de referencia (celdas en amarillo, **Tabla R4**), como la posición HA 700 del mutante 2. Se puede interpretar que estas posiciones sufren fácilmente deriva génica, y que probablemente no sean relevantes para el

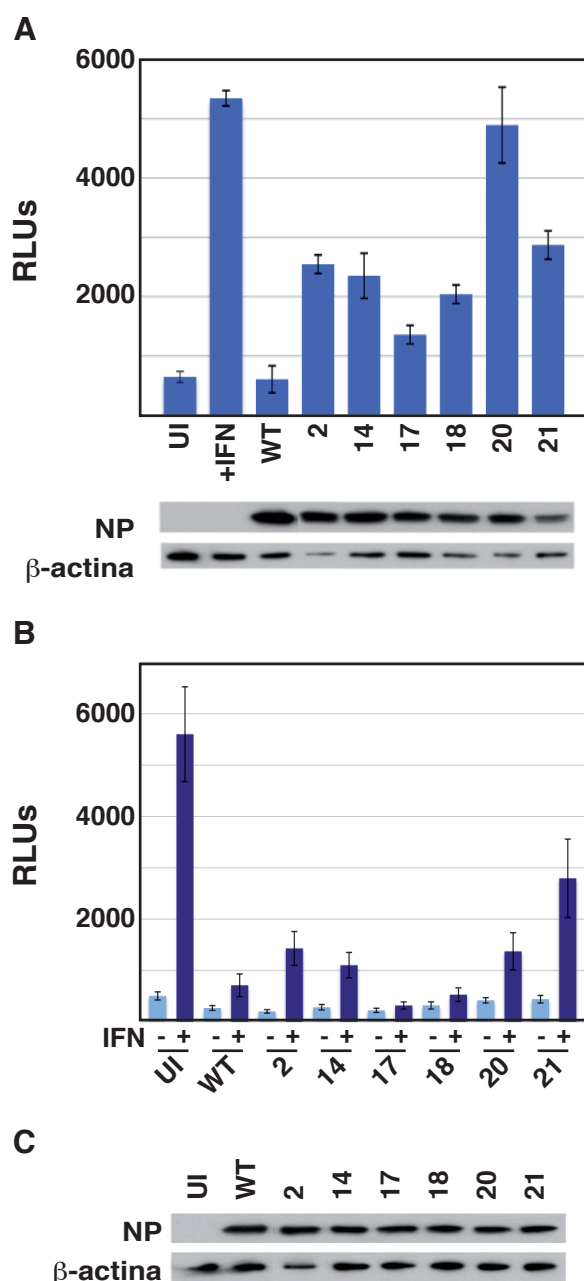


Figura R26. Inducción de Luciferasa bajo el promotor ISRE del virus Vic y de los clones mutantes seleccionados.

A) Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549/pr(ISRE).Luc a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A las 7 horas post-infección se añadió IFN- α en los casos indicados. Pasadas 13 horas desde el momento de la infección, se recogieron los extractos celulares y se determinó la expresión de luciferasa. Como control, se analizó mediante *Western-blot* la acumulación de NP y β -actina usando anticuerpos específicos. **B)** Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549/pr(ISRE).Luc-BVDV-N^{pro} a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A las 7 horas post-infección se añadió IFN- α en los casos indicados. Pasadas 13 horas desde el momento de la infección se recogieron los extractos celulares y se determinó la expresión de luciferasa. **C)** Los extractos celulares correspondientes a las muestras tratadas con IFN en el panel B se usaron también para medir la acumulación de NP y β -actina.

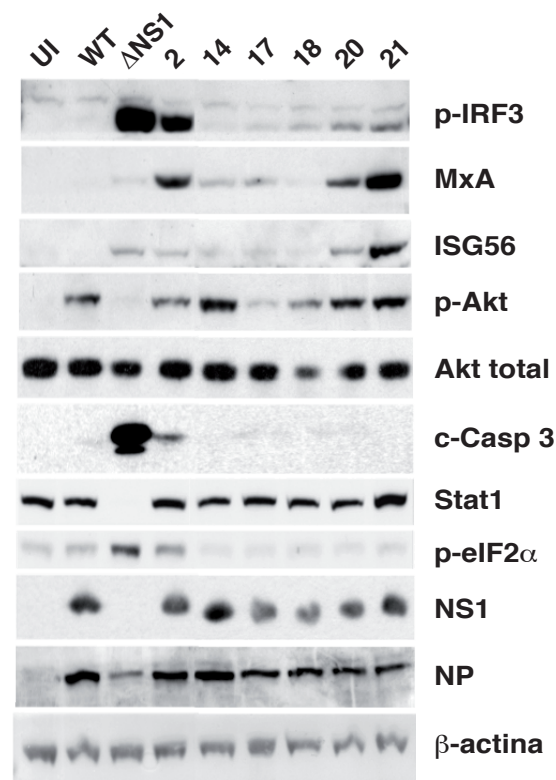


Figura R27. Análisis de la respuesta celular durante la infección del virus Vic, delNS1 y de los clones mutantes seleccionados.

Se infectaron o pseudo-infectaron (UI) células A549 a alta mdi (5 ufp/célula) con el virus Vic, delNS1 o con los diferentes clones mutantes seleccionados. A las 16 horas post-infección se recogieron los extractos celulares y se analizó el estado de diferentes factores celulares y proteínas virales mediante *western-blot* con anticuerpos específicos.

fenotipo de los virus analizados. Por el contrario, aquellas posiciones con una variabilidad muy baja en los virus control (celdas naranjas, **Tabla R4**), como es el caso de la posición NS 217 en el mutante 2, podrían considerarse como relevantes para el fenotipo.

Un cierto número de esas variaciones originan mutaciones a nivel de proteína. Los cambios de aminoácido se indican en la **Tabla R4**. Si estudiamos la frecuencia de aparición de dichas mutaciones en las bases de datos de secuencias del virus de la gripe, encontramos que muchas de las posiciones que conllevan un cambio de aminoácido son conservadas (celdas en azul) o poco variables (celdas en azul claro). Cabe destacar que la mayoría de los cambios de aminoácido no afectan a NS1. De hecho, únicamente la mutación I64T del mutante 2 afecta a esta proteína. El resto de virus

Tabla R4. Resumen de las mutaciones encontradas en los clones aislados

MUTANTE	RNA	POSICIÓN	CAMBIO NT	CAMBIO AA	% NT alternativo	% variación en Mi	% variación en Ms	FRECUENCIA APARICIÓN	
2	HA	700	C-A	T224I	0.43	39.88	47.21	V	
		858	T-A	L277M	0.51	43.1	44.69	V	
		1296	A-C	I423L	0.43	12.63	0.13	C	0/3222
	NP	1302	A-T	-	0.59	1.03	0.44		
14	NA	1406	G-A	D463N	30.46	20.12	3.12	POCO V	79/4312
	NS	217	T-C	I64T	0.59	0.86	0.2	C	0/6226
	PB2	1167	A-G	-	9.8	2.16	0.3		
	PB1	426	C-T	-	10.95	3.5	0		
		1387	A-G	N455D	10.02	1.01	0.12	C	31/6199
	HA	132	C-T	H35Y	6.58	3.24	0.17	C	0/3226
17		266	A-G	I79M	8.83	0.6	0	V	0/3226
	M	394	A-C	-	17.81	17.41	1.04		
	PB2	2057	A-C	E677A	42.12	1.50	0.08	C	3/6100
	HA	700	C-A	T224K	30.56	39.88	47.21	V	
		858	T-A	L277M	35.22	43.1	44.69	V	
		1296	A-C	I423L	33.95	12.63	0.13	C	0/3226
18	NP	891	A-C	-	31.52	12.25	24.54		
	M	113	G-A	D30N M1	43.74	8.92	39.63	V	
		394	A-C	-	40.96	17.41	1.04		
		969	G-T	A86S M2	44.69	2.91	0.14	POCO V	1/6454
	HA	700	C-A	T224K	4.75	39.88	47.21	V	
		858	T-A	L277M	4.05	43.1	44.69	V	
20		1427	A-T	E466D	4.6	11.61	17.12	C	9/3226
	M	370	A-G	I115M M1	28.49	0.59	0.27	POCO V	0/6607
		869	T-C	-	29.61	30.13	25.95		
	HA	1194	G-T	A389S	32.22	2.03	0.19	POCO V	1/6326
		1241	G-A	-	30.37	8.88	2.57		
	NA	1381	G-A	-	30.94	2.95	0.07	V	
21		1406	G-A	D463N	38.81	20.12	3.12	POCO V	79/4312
	M	113	G-A	D30N M1	41.71	8.92	39.63	V	
		394	A-C	-	45.51	17.41	1.04		
		869	T-C	-	45.93	30.13	25.95		
		969	G-T	A86S M2	46.73	2.91	0.14	POCO V	1/6454
	NS	176	C-T	-	40.73	4.39	0	V	
21	M	113	G-A	D30N M1	38.41	8.92	39.63	V	
		394	A-C	-	40.47	17.41	1.04		
		969	G-T	A86S M2	36.41	2.91	0.14	POCO V	1/6454

% NT alternativo: porcentaje de aparición del segundo nucleótido más variable en la cuasiespecie, **% Variación en Mi:** variabilidad media por posición del genoma en el lote de virus original (Pase 0), **% Variación en Ms:** variabilidad media por posición del genoma en la población control M1 después de ser seleccionada por cell-sorter, **FRECUENCIA DE APARICIÓN:** Frecuencia de aparición de las mutaciones en las bases de datos de secuencias de gripe (**C:** posición conservada; **POCO V:** Posición poco variable, **V:** posición variable). Los cambios de nucleótido que aparecen en la secuencia consenso cuando se compara con la original aparecen en rojo. En azul se muestran los cambios que aparecen en un porcentaje alto de las secuencias (superior al 30%), pero que no llegan a alterar la secuencia consenso. En amarillo se reflejan aquellas posiciones altamente variables en las poblaciones control Mi y Ms, y en naranja las poco variables. En azul oscuro aquellas posiciones conservadas en las bases de datos de secuencias de gripe, y en azul claro las poco variables.

analizados no presentan mutaciones en NS1. Como se ha visto anteriormente, el fenotipo del mutante 2 es muy similar al del virus del NS1, lo que sugiere que la mutación NS1 I64T podría ser la responsable del fenotipo. El mutante 14 presenta una mutación en la subunidad PB1 de la polimerasa (N455D) que podría alterar la eficiencia de replicación del RNA. Esta mutación podría explicar el retraso observado en las cinéticas de replicación de este virus (**Figura R19**). El resto de mutantes (17-21) presentan mutaciones en M1 (mutante 18, M1 I115M) o en M2 (mutantes 17, 20 y 21, M2 A86S). Estos cambios aparecen con una frecuencia muy baja en las bases de datos de secuencias de gripe (0/6607 y 1/6456 respectivamente), lo que podría indicar que son relevantes para el fenotipo de los mutantes estudiados.

2.7. Detección de delecciones en el genoma de los mutantes seleccionados

Tradicionalmente, la inducción de la respuesta IFN se ha asociado a una alta presencia de DIs tanto en gripe como en otros virus, como Sendai o PIV5 (Baum & García-Sastre, 2010; Killip *et al.*, 2013; Strahle *et al.*, 2006). Aprovechando los datos de ultrasecuenciación quisimos detectar y cuantificar la posible presencia de DIs en los viriones purificados. Mediante herramientas bioinformáticas se analizó en cada uno de los clones individuales la presencia de delecciones con un tamaño mínimo de 15 nucleótidos y permitiendo como máximo un error por secuencia. Únicamente se tuvieron en cuenta los eventos que aparecían un mínimo de dos veces. Un resumen con todas las delecciones encontradas se muestra en las **Tablas R5 y R6**. Los datos completos para todos los virus se encuentran en el **Anexo 2** y en la **Figura R28** se muestra un ejemplo esquemático del resultado para dos de las muestras. Como se puede observar, se han hallado un gran número de delecciones en todas las muestras. En su mayoría son muy infrecuentes y se distribuyen más o menos de forma aleatoria (**Tabla R5** y **Anexo 2**). Estas delecciones se pueden interpretar como errores que la polimerasa comete durante la replicación, pero que no se amplifican o encapsidan eficientemente, y por ese motivo sólo se detectan unas pocas copias. En ese sentido esta técnica detecta también en un pequeño número mRNAs de las formas procesadas de los segmentos M y NS (marcadas

con *). Estos mRNA son claramente RNA contaminante, lo que explica el bajo número de repeticiones.

Si nos centramos sólo en las delecciones que se repiten un gran número de veces (superior a 20 repeticiones, **Tabla R6**) se observa que únicamente derivan de los genes de la polimerasa PB1, PB2 y PA. Se pueden distinguir dos tipos de delecciones diferentes: cortas (100-200 nt) y largas (alrededor 2000 nt). Las delecciones largas podrían representar los clásicos DIs. De acuerdo con la bibliografía los DIs derivan de los genes de la polimerasa y replican y/o se empaquetan muy eficientemente. Llama la atención que estas delecciones no se reparten por igual entre los diferentes virus analizados, sino que se acumulan de forma preferencial en los mutantes 18, 20 y 21. El mutante 17 presenta una situación intermedia. Para verificar que estas diferencias son reales se purificó RNA de viriones de cada una de las muestras y se analizó mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para los extremos de los genes de la polimerasa. En la **Figura R29** se observa que efectivamente los mutantes 18, 20 y 21 acumulan RNA con grandes delecciones, mientras que en el resto de virus la banda mayoritaria corresponde al segmento completo. El mutante 17 muestra un fenotipo intermedio.

Se puede argumentar, que estas diferencias se deben a la forma de realizar los pases de los diferentes virus, a pesar de que en todos los casos los pases se han realizado en paralelo y a baja mdm precisamente para evitar la acumulación de DIs. Para descartar esta posibilidad, se infectaron monocapas de células MDCK-V2 con los mutantes 18, 20 y 21, y se aislaron virus a partir de placa para cada uno de ellos. Mediante RT-PCR se analizó la presencia de RNAs defectivos en estas muestras. Los resultados (**Figura R29**; carriles 18.3, 20.1 y 21.7) indican que estos mutantes generan RNAs defectivos muy eficientemente. Cabe destacar, que los tamaños de estos RNAs en las muestras aisladas a partir de placa y la de los stock de virus originales es diferente. Este hecho indica que los RNAs defectivos observados son de nueva generación, y descarta que haya habido una contaminación desde el lote de virus original.

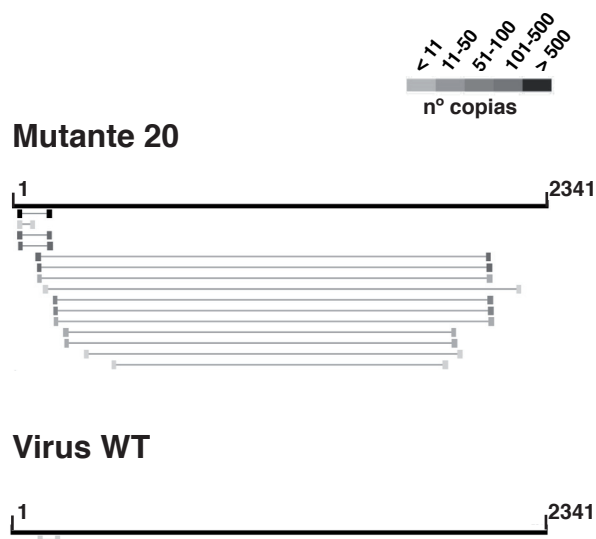


Figura R28. Representación esquemática del tamaño y abundancia de las deleciones encontradas en el RNA genómico viral.

Representación esquemática del tamaño y la abundancia de las deleciones encontradas en el segmento PB1 en el virus Vic silvestre y en el mutante 20. Están representadas aquellas deleciones con una longitud mínima de 15nt y que aparecen al menos 5 veces. El número de copias presentes de cada tipo de deleción se indica con un código de color.

2.8 Rescate de mutaciones puntuales en virus infectivo por el sistema de transfección de plásmidos

Teniendo en cuenta los experimentos realizados y según el fenotipo y el genotipo, los virus mutantes individuales se pueden dividir en 2 grupos. El mutante 2 es el único afectado en NS1 (I64T) y su fenotipo es muy similar al del virus del NS1: Fuerte activación de IFN, defecto en bloqueo de la activación de ISGs, activación parcial de apoptosis y baja replicación en células A549 y MDCK. Por otro lado, los mutantes 18, 20 y 21 inducen IFN e ISGs y presentan defectos en el bloqueo de la señalización por IFN. Estos virus acumulan grandes cantidades de RNAs defectivos a pesar de replicar a títulos altos y todos presentan mutaciones en M1 y M2.

Para estudiar si el fenotipo descrito más arriba se debe a las mutaciones identificadas se rescataron virus que portan las mutaciones más interesantes. Se decidió rescatar las mutaciones NS1 I64T (mutante 2), M1 I115M (mutante 18) y las mutaciones M1 D30N y M2 A86S (mutantes 20 y 21). En el caso de estas dos últimas, además de rescatar virus con las mutaciones de forma

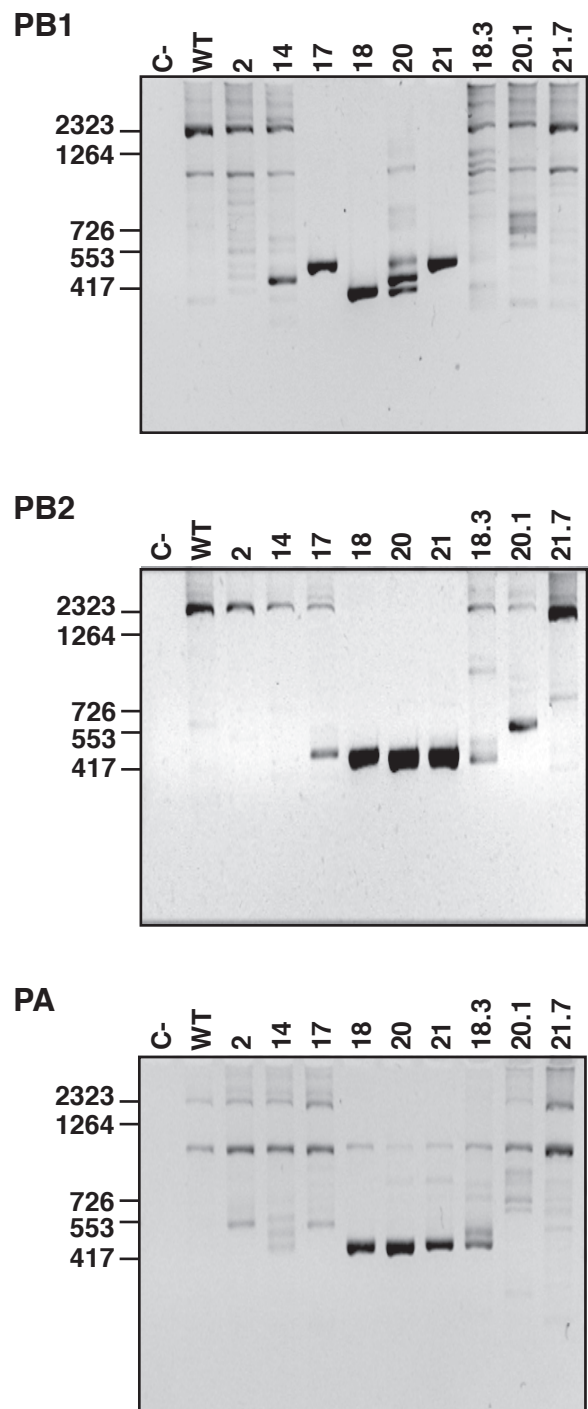


Figura R29. Verificación experimental de la presencia de RNAs delecionados.

Se purificó RNA a partir de viriones del virus Vic silvestre y de los mutantes 2, 14, 17, 18, 20 y 21 y se realizaron reacciones de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de los extremos de los segmentos PB1, PB2 y PA. El producto se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa para observar la presencia de RNAs con grandes deleciones. El mismo protocolo se usó para analizar virus aislados de placa a partir de los mutantes 18, 20 y 21 (carriles 18.3, 20.1 y 21.7). La movilidad de marcadores de tamaño conocido (Nts) se indica a la izquierda de cada panel.

Tabla R5. Resumen de las deleciones presentes en los mutantes (N>2)

	PB2		PB1		PA		HA		NP		NA		M		NS	
	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L
wt	2		5		2		2		27		8		4	4*	6	24*
2	6	7	3	29	5	35								5*		35*
14	24	4	20	44	6	150			2				6			5*
17	12	7	6	549	6	115	2		7		9		2			6*
18	37	756	254	120	16	831			2		4	2	21		4	2*+7
20	98	2136	2698	848	72	3434	24	18	10	20	30	20	34	8*+6	18	14*+4
21	15	676	18	564	18	1101			2					2*		5*

Tabla R6. Resumen de las deleciones más abundantes (N>20)

	PB2		PB1		PA		HA		NP		NA		M		NS	
	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L
wt																
2																20*
14						113										
17				456												
18		756	248	59		765										
20		2096	2632	728		3294										
21		632		472		1005										

N: número de repeticiones de cada evento, C: Deleciones cortas (tamaño inferior a 200nt), L: Deleciones largas (tamaño superior a 200nt), *: mRNAs de las formas procesadas de los segmentos M y NS.

individual, se rescató un virus mutante doble con ambas mutaciones, tal y como aparecen en los virus originales. Se realizó una mutagénesis dirigida sobre el plásmido pHHNS1 (**apartado 1.2** de Materiales y Métodos), y se procedió a rescatar virus mediante el sistema de transfección de plásmidos (**apartado 3.8** Materiales y Métodos). Durante la escritura de esta Tesis se está analizando el fenotipo de estos mutantes.

DISCUSIÓN

1. Mutagénesis al azar: una estrategia segura

Una de las estrategias llevadas a cabo en esta Tesis para entender los mecanismos que ha desarrollado el virus para contrarrestar la respuesta IFN se ha basado en la mutagénesis al azar del segmento NS. Este tipo de estrategia se ha utilizado en varias ocasiones con bastante éxito (Garaigorta *et al.*, 2005; Hatada *et al.*, 1990). Aunque no resulta novedosa, presenta una serie de ventajas. En primer lugar permite centrarse únicamente en uno de los segmentos del virus, NS, cuyo papel clave en el control de la respuesta innata ha sido ampliamente descrito (Egorov *et al.*, 1998; García-Sastre *et al.*, 1998; Kochs *et al.*, 2007a). De esta forma se simplifica el problema, y se aumenta la probabilidad de encontrar virus afectados.

Por otro lado, esta estrategia permite obtener un gran número de mutantes de partida con una variabilidad de mutaciones muy alta. Además, adecuando la concentración de análogos de nucleótido usados en la PCR mutagénica (**Figura R1**) se puede controlar el número de mutaciones por segmento. La genoteca generada en esta Tesis contiene entre 30.000 y 40.000 mutantes puntuales cada uno con 2 o 3 cambios de aminoácido de media. Hay que destacar que el sistema de rescate utilizado mediante transfección de RNPs silvestre y un exceso de RNPs mutante ha permitido mantener gran parte de esa variabilidad que existía en la genoteca de plásmidos (**apartado 1.3 y 1.4 Resultados**). Es difícil pensar que en esa mezcla no existan potenciales mutantes en el bloqueo de la respuesta IFN. Los mutantes seleccionados producen cantidades de IFN superiores al virus silvestre (**Figuras R5, R11 y R12A**) lo que refuerza la idea de que este tipo de estrategias son útiles.

Por otro lado, en este tipo de abordajes existen también una serie de claras desventajas. La principal es que las mutaciones introducidas pueden afectar a otras funciones importantes del virus, aunque las mutaciones letales o que afecten gravemente a los procesos esenciales del virus deberían eliminarse en el paso de rescate. El rescate de la genoteca y la posterior secuenciación de algunos de los clones, reveló que la proporción de mutantes respecto a la del virus silvestre era del 70% (**Apartado 1.4 Resultados**), valor bastante

inferior al obtenido en un rescate control con RNPs NS WSN (superior al 90%) (**Figura R2B**). Esta diferencia posiblemente refleja esa parte de las mutaciones introducidas que son letales, y que por tanto no son rescatadas.

En el caso del segmento NS, el problema de que otras funciones importantes estén afectadas puede verse agravado. Este segmento codifica 2 proteínas (NS1 y NEP) para las que han sido descritas multitud de funciones durante el ciclo de infección (Bornholdt & Prasad, 2006; Hale *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2007). En concreto, la proteína NS1 es de pequeño tamaño y se asocia a multitud de factores celulares, por lo que cabe esperar que muchas funciones se encuentren solapadas en la secuencia, tal y como se ha descrito previamente (Min *et al.*, 2007). A pesar de ese posible inconveniente, el uso de un paso de selección por expresión de GFP en células infectadas permitió identificar mutantes que no presentan defectos importantes en la replicación en células que expresan IFN, como A549 y MDCK (**Figuras R6, R7, R8, R9 y R10**).

Al analizar la frecuencia de aparición de dichas mutaciones en las bases de datos de secuencias del virus de la gripe, encontramos que muchas de las posiciones que conllevan un cambio de aminoácido son conservadas en las bases de secuencias del virus (11 de 13) (**Tabla R1 y Figura R4**). Estos datos hacen pensar que efectivamente, y tal como demuestran los resultados de expresión de IFN (**Figuras R5, R11 y R12A**), dichas posiciones tienen importancia para el bloqueo de la respuesta IFN. Además, algunas de las mutaciones encontradas en los virus seleccionados (I123V y S195P) ya han sido descritas anteriormente (Garaigorta *et al.*, 2005; Min *et al.*, 2007). Todos estos datos apoyan la idea de que tanto el método utilizado en la generación de mutantes, como el de *screening*, conforman una potente herramienta para la generación de virus potencialmente atenuados.

2. Relajar la presión selectiva: Una estrategia contraintuitiva

La estrategia anterior presupone que la proteína NS1 es el factor viral primordial para contrarrestar la respuesta celular innata. Para averiguar si existen otros genes virales implicados en el bloqueo de esta respuesta y su

relevancia en la infección, se ha llevado a cabo un método para la generación de mutantes opuesto y complementario al anterior, que consiste en la realización de pases seriados de un virus silvestre en células que tienen bloqueada esta respuesta (células MDCK-V2). En este caso, podrían identificarse mutaciones en cualquier parte del genoma y los datos obtenidos (**Tabla R2**) muestran que esta hipótesis es cierta. Una ventaja adicional es que la realización de pases seriados evita la acumulación de aquellas mutaciones que afecten a la eficacia de replicación del virus. De hecho, los resultados con los mutantes aislados (**Figuras R19, R20, R21, R22 R23 y R24**) demuestran que estos virus no presentan problemas de replicación en células con la respuesta interferón activa.

Hasta el momento, nuestro conocimiento sobre cómo el virus de la gripe es capaz de contrarrestar la respuesta antiviral de la célula se han basado principalmente en dos tipos de evidencias experimentales: 1) el estudio fenotípico de mutantes puntuales o de delección de NS1, en el que se podría integrar la primera aproximación usada y 2) el estudio de la aparición de mutaciones al incrementar la presión selectiva que supone el IFN para el virus. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se realizaron pases seriados de un virus del NS1 en células MDCK (Van Wielink *et al.*, 2012). En este caso, se induce un cuello de botella poblacional y se fuerza al virus a encontrar una solución rápida, que podría no coincidir con los mecanismos que normalmente el virus explota para contrarrestar esta respuesta. De hecho, los autores observan un aumento de la replicación en los virus adaptados, pero no se producen cambios en los niveles de inducción de IFN respecto del virus del NS1 original. Es interesante destacar que las mutaciones descritas en este trabajo implican cambios en la expresión de M1 o en la localización de esta proteína.

En esta Tesis se ha seguido una estrategia novedosa y diametralmente opuesta a la descrita por Van Wielink y colaboradores. Se ha eliminado la presión selectiva que supone la respuesta IFN, y se ha permitido la evolución del virus hasta encontrar un nuevo equilibrio. En un principio, la única diferencia de las células MDCK-V2 respecto a las células control MDCK es que el sistema interferón está bloqueado. Teóricamente, al haber eliminado esta presión selectiva, se permite

la acumulación de mutaciones que afecten al bloqueo de esta respuesta. Esta acumulación estaría imposibilitada en células normales. Dentro del conjunto de mutaciones que se puedan generar, muchas afectarán negativamente a otras funciones o propiedades del virus, por lo que tampoco se fijarán en el genoma, tal y como se ha indicado anteriormente. Los resultados obtenidos demuestran que los virus aislados no presentan deficiencias importantes de replicación en células MDCK (**Figura R19**) y sin embargo todos ellos inducen la expresión de IFN (**Figuras R18, R25 y R26A**). En este caso, y a diferencia de la estrategia de mutagénesis del segmento NS, las mutaciones pueden afectar a cualquier parte del genoma, y de hecho, los resultados obtenidos así lo reflejan (**Tabla R2 y Tabla R4**).

A pesar de que los virus seleccionados inducen la expresión de IFN, la estrategia experimental usada no garantiza que las mutaciones identificadas afecten a posiciones implicadas en el bloqueo de la respuesta. Aún así, existen dos observaciones adicionales que sustentan esta idea: 1) la gran mayoría de las mutaciones encontradas, tanto en las poblaciones virales como en los mutantes individuales, se presentan en posiciones con un alto grado de conservación en las bases de datos de secuencias, y 2) muchas de las mutaciones identificadas aparecen en varias de las poblaciones seleccionadas, y también en los mutantes individuales aislados (**Tabla R2 y Tabla R4**). En conjunto, estos resultados hacen pensar que la gran mayoría de ellas realmente se han seleccionado durante los pases seriados, y junto con el resto de argumentos, apoya la idea de que la estrategia utilizada es adecuada para este tipo de análisis.

3. Mecanismos de bloqueo de la respuesta IFN por parte del virus de la gripe

Vistas en conjunto, ambas estrategias presentan ventajas e inconvenientes, pero cada una de ellas por sí sola ha resultado útil y eficaz para el objetivo propuesto. Además, al tratarse de aproximaciones complementarias, han permitido obtener una imagen general de los mecanismos desarrollados por el virus para contrarrestar la respuesta IFN.

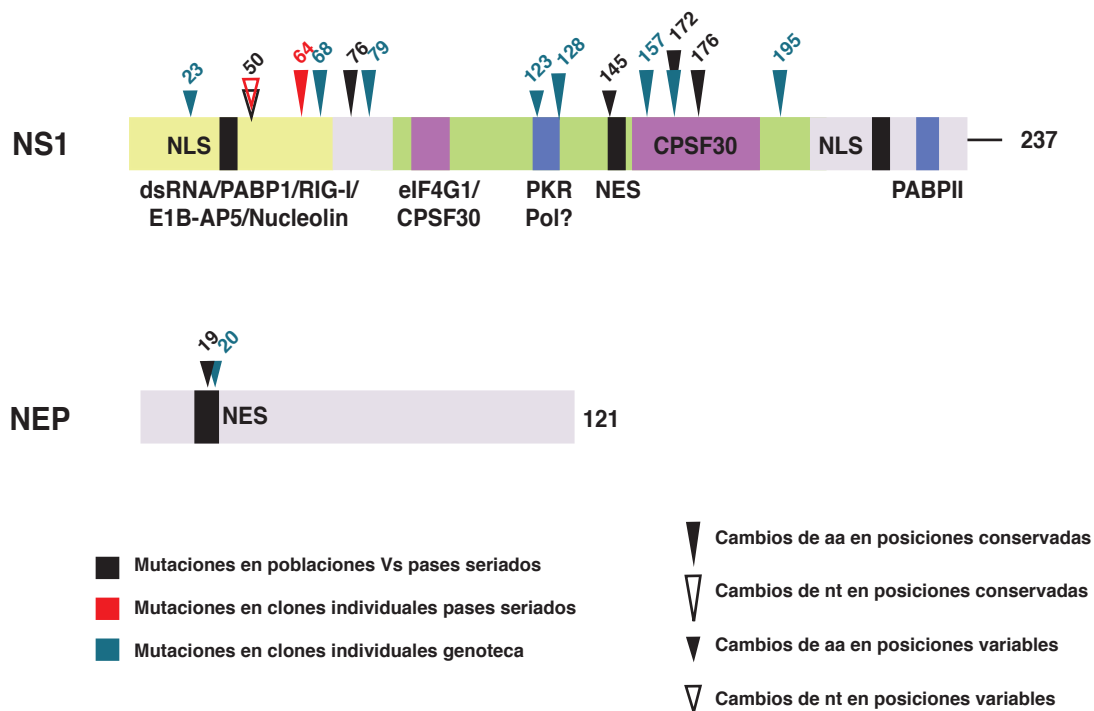


Figura D1. Resumen de las mutaciones que afectan a NS

Representación esquemática de las proteínas NS1 y NEP en la que se reflejan aquellas mutaciones que han aparecido en las diferentes estrategias: en las poblaciones generadas en los pases seriados (negro), en los clones individuales aislados a partir de los pases seriados (rojo) y en los clones de la genoteca generada mediante mutagénesis (azul). Los cambios de nucleótido se reflejan como flechas vacías y los cambios de aminoácido como flechas llenas. Las flechas altas indican posiciones conservadas y las flechas pequeñas posiciones variables en las bases de datos de secuencia.

3.1. Papel de NS1 en el bloqueo de la respuesta IFN

Tanto en la mutagénesis al azar, como en la estrategia de los pases seriados, se han encontrado mutaciones que afectan a NS1. Si las observamos todas en conjunto, se pueden sacar algunas conclusiones interesantes (**Figura D1**). Un gran número de ellas se sitúan en los residuos que conforman el *linker* que conecta los dos dominios principales de la proteína (residuos 74-86) o en el área cercana al mismo (Bornholdt & Prasad, 2008). Como se puede observar en la **Figura D2-C**, la estructura derivada del cristal de la proteína completa indica que esta región es flexible.

La mutación I123V ha sido descrita anteriormente como importante para la unión e inhibición de PKR (Li *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2007). Este paso es un punto clave de la respuesta antiviral, y existen numerosos estudios que demuestran que la inhibición de esta enzima por parte del virus es importante para contrarrestar dicha respuesta (Bergmann *et al.*, 2000). Además, se ha descrito que este residuo es necesario para

la unión a la polimerasa viral y para mediar la regulación temporal de la síntesis de vRNA (Min *et al.*, 2007).

La mutación S195P también ha sido descrita anteriormente, junto con otras mutaciones, en un virus termosensible (Garaigorta *et al.*, 2005). Parece que esta mutación induce un cambio drástico en la estructura de la proteína (**Figura D2-B**), aunque un virus rescatado que porta únicamente esta mutación presenta un título final similar al de un virus silvestre y no es termosensible (Tesis doctoral U. Garaigorta, 2007). Lamentablemente no se poseen datos del efecto en la respuesta IFN de dicho virus.

La mutación E172K ha aparecido de forma independiente usando ambas estrategias y corresponde además a una posición altamente conservada en las bases de datos de secuencia. Está localizada en el región de unión de NS1 a CPSF30, aunque no se considera necesaria para la unión (Das *et al.*, 2008; Kochs *et al.*, 2007b; Li *et al.*, 2001; Noah *et al.*, 2003; Twu *et al.*, 2006, 2007). La estructura de NS1 muestra que dicho cambio probablemente produce una

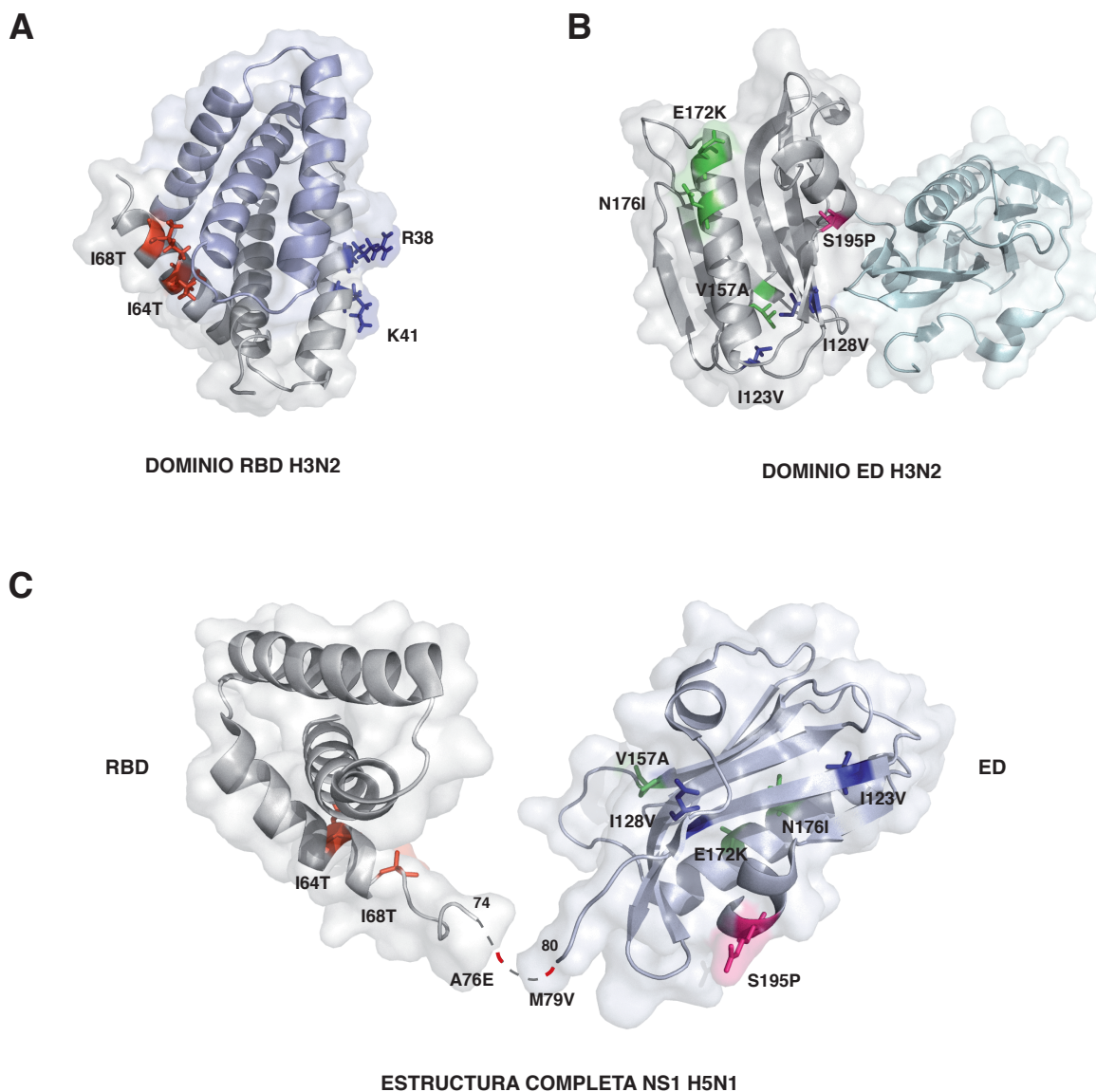


Figura D2. Estructura de la proteína NS1 con las mutaciones estudiadas

A) Estructura del dímero del dominio de unión a RNA (1-73aa) de NS1 de un virus H3N2. En rojo se representan las mutaciones encontradas que afectan a este dominio (I64T y I68T) y en azul se indican las posiciones R38 y K41 implicadas en la unión a RNA. (adaptado de Chien et al., 1997). **B)** Estructura del dímero del dominio efector (84-205) de NS1 de un virus H3N2. En verde se representan las mutaciones que afectan a la región de unión a CPSF30 (V157A, E172K y N176I), en azul las que afectan a la región de unión a PKR (I123V y I128V) y en rosa la mutación S195P (adaptado de Xia et al., 2009). **C)** Estructura de la proteína NS1 completa de un virus H5N1. Se representan las mismas mutaciones que antes y las que afectan al loop de unión (A76E y M79V) (adaptado de Bornholdt & Prasad, 2008).

desestabilización de la región cercana (**Figura D2-B**), lo que podría explicar por qué el mutante 12 presenta una disminución en la acumulación de NS1 (**Figuras R8, R10 y R13**). Es necesario estudiar con más profundidad si en este mutante la unión de NS1 a CPSF30 está afectada, y también sería interesante estudiar la acumulación y vida media de la proteína. Muy cerca de esta mutación, y en la misma región de unión a CPSF30, se ha encontrado también otra una posición altamente conservada (N176I) (**Figura D2-B**). Ambas

posiciones se encuentran situadas en la misma hélice- α , y tienen la misma orientación. Existen varios trabajos que indican que la unión a CPSF30 puede ser un mecanismo clave para el control del sistema IFN por parte del virus. Un virus que expresa una proteína NS1 incapaz de unir este factor induce fuertemente IFN, y es atenuado tanto en células competentes como deficientes en esta respuesta (Noah *et al.*, 2003; Twu *et al.*, 2006), lo que indicaría que la interacción con CPSF podría tener funciones adicionales al control de IFN.

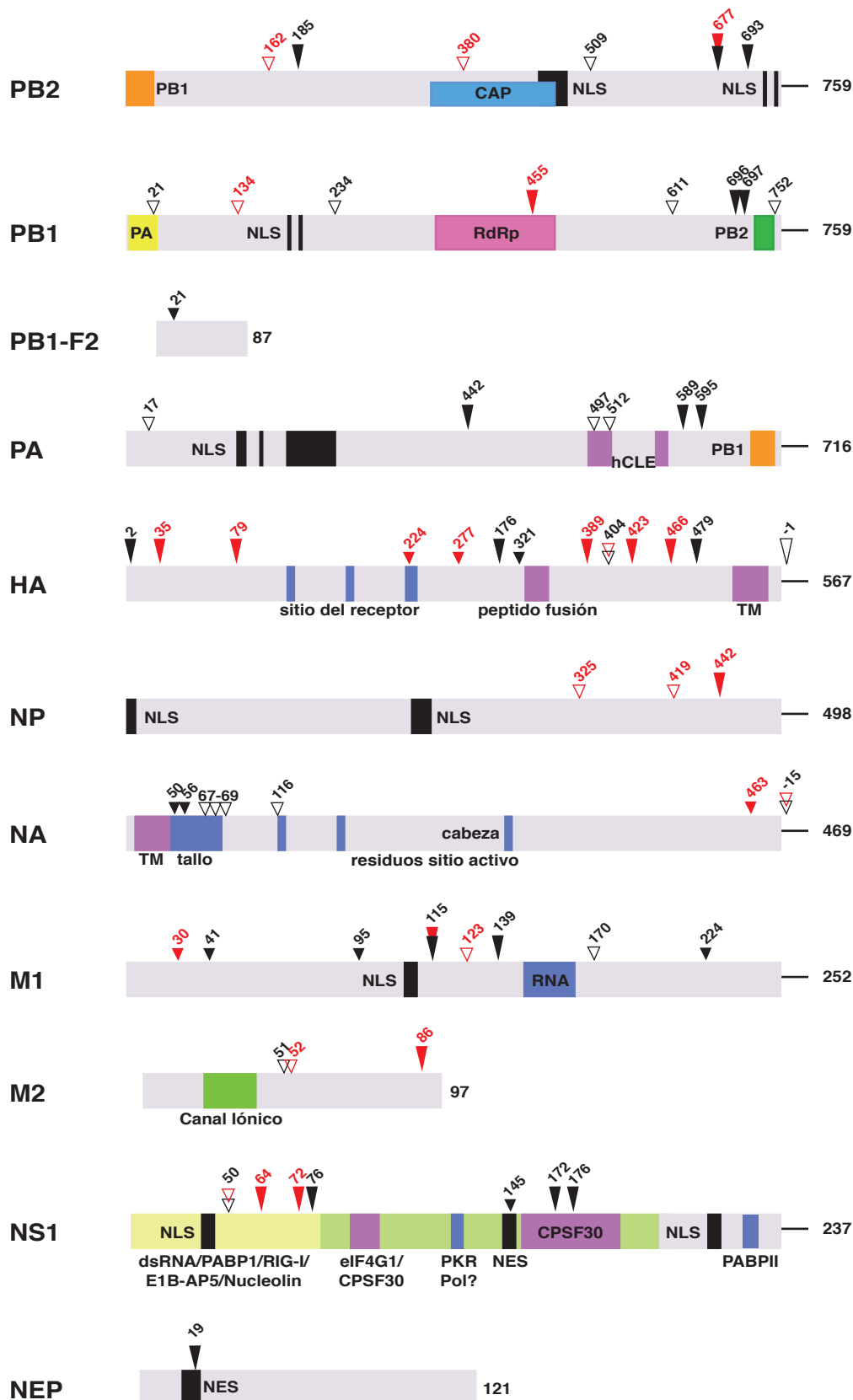
La mutación I64T presenta también un fenotipo muy acentuado. Esta mutación, al igual que la I68T, está situada en la hélice- α 3 del dominio de unión a RNA. Ambas posiciones tienen la misma orientación, y se sitúan en la superficie de interacción con la hélice- α 1 perteneciente a la otra cadena del dímero (**Figura 3D-A**). Se puede especular que estas mutaciones podrían afectar a la interacción del dímero.

El comportamiento de estos dos últimos mutantes (mutantes 2 (I64T) y 12 (E172K)) es muy similar al del virus del NS1: Fuerte activación de IFN, defecto en bloqueo de la activación de ISGs, activación parcial de apoptosis y baja replicación en células A549 y MDCK. Es destacable que una única mutación puntual tenga un efecto tan dramático en el bloqueo de la respuesta IFN y que éste sea muy similar al del virus del NS1, que carece de la totalidad de la proteína. En ambos casos la localización de la proteína es normal a lo largo de la infección (**Figuras R10 y R24**) y, aunque se puede argumentar que existe cierta reducción en la acumulación de la misma, muy probablemente el fenotipo no se sustente sólo en esta ligera disminución. Hay que tener en cuenta que ambos virus replican con títulos altos en células deficientes en la respuesta IFN, y los títulos obtenidos en células normales, aunque inferiores a un virus silvestre, no son tan bajos como los del virus del NS1 (**Figuras R6 y R19**). Estos datos hacen pensar que en ambos casos estas mutaciones afectan principalmente al bloqueo de la respuesta IFN por parte de NS1, sin afectar de manera significativa a otras funciones de la misma. Es interesante destacar que dichas mutaciones se encuentran en posiciones alejadas en la estructura de la proteína, cada una en un dominio distinto. A pesar de ello, y como se ha discutido, el fenotipo de ambos virus es muy similar, aunque en el caso del mutante 12 (E172K) es más acentuado. Estos resultados hacen pensar que estos virus pueden ser atenuados lo que facilitaría su utilización en la generación de vacunas. Además estos virus se pueden crecer con títulos muy altos en células MDCK-V, lo que facilita y simplifica su uso. Está planteado estudiar el comportamiento de dichos mutantes en ratones para comprobar si realmente estos virus son atenuados.

3.2. ¿Qué papel tiene el resto del genoma en el control de la respuesta IFN?

En los últimos años se ha descrito que, además de NS1, otros genes virales son capaces de alterar esta respuesta celular. La subunidad PB2 de la polimerasa inhibe la activación de IPS-1/MAVS (Graef *et al.*, 2010; Iwai *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que PB1-F2 podría tener un papel modulador en la respuesta IFN, aunque hay datos contradictorios sobre el papel concreto que ejerce (Conenello *et al.*, 2011; Dudek *et al.*, 2011; Le Goffic *et al.*, 2010; Varga *et al.*, 2011). La proteína NP también podría tener una función reguladora inhibiendo la actividad de PKR al actuar sobre su inhibidor P58(IPK) (Melville *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2011). Tal y como se ha discutido antes, para determinar si otros genes virales tienen un papel importante en la regulación de la respuesta IFN, se realizaron pases seriados de un virus silvestre en células en las que dicho sistema estaba afectado. El análisis de las poblaciones seleccionadas mediante ultrasecuenciación ha permitido obtener un gran número de posiciones altamente variables (41) que son invariables en las poblaciones control (**Tabla R2**). Como se ha indicado antes, la gran mayoría de mutaciones que conllevan un cambio de aminoácido, corresponden a posiciones altamente conservadas (**Tabla R3**), y algunas de las mutaciones aparecen repetidas en poblaciones distintas. Estos resultados hacen pensar que efectivamente la mayoría de estas posiciones pueden estar asociadas con un fenotipo defectivo en el bloqueo de la respuesta IFN. Si se unifican estas mutaciones con aquellas encontradas en los mutantes individuales aislados de las mismas, podemos hacernos una idea general de aquellas regiones del genoma que pueden ser importantes en esta función (**Figura D3**). Cabe destacar que durante los pases seriados se han acumulado mutaciones en todos los segmentos del virus, y en todas las proteínas.

Entre los cambios detectados hay algunos que parecen interesantes, como es el caso de las posiciones 677 y 693 en la región C-terminal de PB2. Concretamente la mutación G693E podría alterar potencialmente la NLS de dicha proteína y por tanto la unión con la importina- α (Tarendeau *et al.*, 2007). Dichas mutaciones podrían afectar a la virulencia del virus, por lo que sería muy interesante estudiarlas más a fondo. En PB1 caben destacar las mutaciones N455D que



- Mutaciones en poblaciones VS
- ▼ Cambios de aa en posiciones conservadas
- ▽ Cambios de nt en posiciones conservadas
- Mutaciones en clones individuales
- ▼ Cambios de aa en posiciones variables
- ▽ Cambios de nt en posiciones variables

aparece en el mutante 14 y afecta al dominio RdRp y F696L y E697K, muy próximas a la región de interacción de dicha proteína con PB2. La mutación L589I en PA se localiza en el sitio de unión con PB1 (He *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2008). Las proteínas M1 y M2 también acumulan un gran número de mutaciones, y como se ha descrito en los resultados, una gran parte de los clones aislados tienen afectadas dichas proteínas (**Tabla R4**). Aunque se ha identificado un gran número de mutaciones en los segmentos HA y NA, la gran mayoría de ellas aparecen en posiciones altamente variables, lo que hace pensar que pueden ser posiciones en deriva génica. A pesar de ello, no se puede descartar el papel de dichas proteínas en el bloqueo de la respuesta IFN.

Esta variedad de mutaciones sugiere que el virus ha explotado múltiples soluciones para adaptarse a replicar eficientemente en células carentes de respuesta IFN, y que sólo una fracción de las mismas afectan a NS1. En condiciones normales de replicación, cuando la respuesta antiviral está presente, el espacio de secuencia del virus está restringido en prácticamente todos sus genes. Cuando esta presión se elimina, el virus evoluciona hasta encontrar un nuevo equilibrio. Algunas de estas nuevas posibilidades conllevan un aumento de la inducción de IFN en células normales, pero en todos los casos los virus presentan una buena eficiencia biológica. De hecho, todos los mutantes estudiados replican de forma normal en células MDCK, pero lo hacen mejor que un virus silvestre en células MDCK-V2 (**Figura R19**).

3.3 ¿Es realmente NS1 el principal antagonista de la respuesta IFN en el virus?

Los resultados de secuenciación de virus seleccionados después de pases seriados muestran que la mayoría de las mutaciones han aparecido repartidas en el genoma del virus y que, proporcionalmente, muy pocas de ellas aparecen en NS1. Estos datos podrían cuestionar la idea de que NS1 sea el principal factor viral encargado de contrarrestar la respuesta IFN, tal y como indica la mayoría de la bibliografía. Sin

embargo, es importante entender que de los 13.750 nucleótidos que forman el genoma del virus, el gen NS1 sólo representa un 6% del total (830 nt). Este hecho dificulta la acumulación de mutaciones en este segmento, ya que la aparición de éstas durante los pases seriados se debe a un proceso aleatorio. Además, hay que tener en cuenta que NS1 es una proteína que participa en una gran variedad de funciones necesarias para el virus. Un porcentaje de las mutaciones que surgen pueden afectar a dichas funciones, impidiéndose así que se fijen durante los pases consecutivos.

Por otro lado, los mutantes 2 y 12, ambos con una única mutación en NS1, inducen fuertemente la respuesta IFN. Tal y como se ha comentado antes, este dato refuerza la idea de que esta proteína tiene un papel clave en contrarrestar la respuesta antiviral de la célula, en concordancia con los estudios publicados.

4. El papel de las partículas defectivas en la interacción del virus de la gripe con la respuesta celular innata

Un aspecto especialmente relevante del análisis de los datos de ultrasecuenciación de los virus mutantes en el bloqueo de la respuesta IFN ha sido el estudio de las delecciones presentes en el genoma del virus. Hasta el momento la mayoría de los estudios sobre DIs se habían realizado mediante RT-PCR o hibridación (Davis & Nayak, 1979; Davis *et al.*, 1980). Mediante estas técnicas, únicamente se habían descrito aquellos RNAs defectivos que probablemente eran mayoritarios en la población, o que habían sido encontrados por casualidad. El estudio realizado en esta Tesis ha permitido un análisis exhaustivo de los RNAs defectivos presentes en las partículas virales. La extensa información que se ha podido obtener ha permitido comprobar que efectivamente las delecciones se acumulan casi exclusivamente en los segmentos que codifican a la polimerasa (**Tabla R6**). A pesar que existen uno o dos RNAs defectivos que son mayoritarios en cada caso, en la

Figura D3. Resumen de las mutaciones que aparecidas durante los pases seriados

Representación esquemática de las principales proteínas del virus en la que se reflejan aquellas mutaciones que han aparecido durante los pases seriados: en las poblaciones Vs (negro) y en los clones individuales aislados (rojo). Los cambios de nucleótido se reflejan como flechas vacías y los cambios de aminoácido como flechas llenas. Las flechas altas indican posiciones conservadas y las flechas pequeñas posiciones variables en las bases de datos de secuencia.

Figura R28 y en el **Anexo 2** se observa que existen también otras delecciones de tamaño variado que en su mayoría suponen la eliminación de la parte central del segmento. Además, se observan delecciones cortas repartidas por el resto de la secuencia del virus aunque éstas aparecen en un bajo número de repeticiones (**Tabla R5** y **Anexo 2**). Estos datos hacen pensar que la aparición de delecciones es un proceso relativamente frecuente, y que aquellos RNAs defectivos altamente representados probablemente son seleccionados posteriormente a su formación según su eficiencia de replicación y/o de empaquetamiento. Estos datos concuerdan con los experimentos de evolución de DIs a partir de un lote de virus (Janda & Nayak, 1979). Teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la RNP (**Figura In3C**) y los RNAs defectivos encontrados (**Figura R28** y **Anexo 2**), parece evidente que la estructura de la RNP podría facilitar la aparición de delecciones en algunos puntos concretos del segmento durante la replicación del mismo.

El análisis de los datos de ultrasecuenciación no sólo ha permitido caracterizar en detalle la estructura de los RNAs defectivos sino que ha mostrado que la acumulación de los mismos difiere entre unos mutantes y otros (**Tabla R6**) y que este hecho no parece depender de la historia de pases de cada virus, sino más bien del genotipo del mismo (**Figura R29**). El fenotipo de los virus que acumulan más RNAs defectivos (mutantes 18, 20 y 21) es muy similar: alta inducción de IFN e ISGs e incapacidad de contrarrestar el efecto del IFN exógeno (**Figuras R18, R25, R26 y R27**). De forma general, la presencia de estas delecciones de gran tamaño en un lote de virus supone una bajada de título significativa (Huang, 1977; Janda & Nayak, 1979; von Magnus, 1951). Esto es debido a que los virus que contienen RNAs defectivos no son infecciosos e interfieren con la normal replicación del resto de partículas (Huang, 1977). Existen numerosos estudios que indican que estos RNAs defectivos compiten con la incorporación de su vRNA homólogo para su empaquetamiento (Duhaut & McCauley, 1996; Nayak *et al.*, 1982). Este hecho apoya el modelo de empaquetamiento dirigido de las 8 RNPs y además explicaría por qué la replicación de un DI requiere la presencia de un virus infeccioso homólogo (Huang, 1977). Sin embargo, los mutantes 18, 20 y 21, a pesar de acumular grandes cantidades de RNAs defectivos, replican con títulos altos (**Figura R19**). Como se ha

indicado anteriormente, todos estos mutantes presentan mutaciones en las proteínas M1 y/o M2 (**Tabla R4**). Estas proteínas se han implicado en los procesos de encapsidación y morfogénesis de los nuevos viriones (Rossman & Lamb, 2011; Rossman *et al.*, 2010), y se ha descrito que tanto la forma como el tamaño de las nuevas partículas está determinado por M1 (Bourmakina & García-Sastre, 2003; Burleigh *et al.*, 2005; Hughey *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2002; Roberts & Compans, 1998). En conjunto, estos datos hacen pensar que probablemente estas mutaciones estén afectando a la encapsidación de las RNPs del virus permitiendo el empaquetamiento de un número superior a 8. Anteriormente se ha descrito la presencia de viriones con un número superior de vRNPs (9-11) (Bancroft & Parslow, 2002; Enami *et al.*, 1991), y que preparaciones de lotes de virus con grandes acumulaciones de DIs contienen una proporción mayor de partículas pleomórficas (Kennedy, 1976; Lenard & Compans, 1975; Nayak, 1969).

5. ¿Qué molécula actúa como PAMP por virus de la gripe?

En los últimos años se ha generado un gran debate sobre qué molécula actúa como PAMP en la infección gripal. Se ha demostrado que una gran variedad de RNAs sintéticos son capaces de activar RIG-I, pero es difícil decir cuál es el RNA que actuaría como inductor en una infección real. Tradicionalmente se había pensado que estos inductores eran moléculas de dsRNA, que se unirían no sólo a los diferentes sensores celulares o PPRs (Marcus & Sekellick, 1977; Marcus, 1983), sino también a varias de las enzimas con actividad antiviral que se inducen en respuesta a IFN, como PKR y 2'-5'OAS (Galabru & Hovanessian, 1987; Patel & Sen, 1998). Mientras que en otros virus se ha descrito la presencia de dsRNAs, en principio, en células infectadas por gripe estos RNAs no deberían existir. En los últimos años se ha descrito que RNAs con extremos 5' trifosfato y regiones parciales de doble banda podría actuar también como inductor (Cui *et al.*, 2008; Takahasi *et al.*, 2008), y varios trabajos apuntan a que este tipo de RNAs sería el sustrato predilecto de RIG-I (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). Como se ha indicado en la Introducción (**apartado 4.1**) diferentes grupos han analizado el RNA unido a RIG-I en células infectadas por

virus de la gripe, y en todos los casos han encontrado RNA genómico del virus (Baum *et al.*, 2010; Rehwinkel *et al.*, 2010). El genoma del virus de la gripe presenta terminaciones 5'-PPP, y además los extremos 5' y 3' son capaces de anillar en una estructura conocida como *panhandle*. En ese sentido, estos RNAs cumplen las características estructurales que se han descrito como necesarias para activar RIG-I, pero durante una infección normal estos RNAs se encuentran siempre unidos a proteínas formando las RNPs, lo que evitaría su reconocimiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inducción de IFN durante la infección viral de células epiteliales no ocurre inmediatamente después de la entrada del virus como ocurre en las infecciones bacterianas. Existen trabajos que indican que es necesario el paso de replicación, aunque no así el de transcripción (Rehwinkel *et al.*, 2010). Es posible pensar que algún producto aberrante de la replicación, o bien RNAs degradados puedan actuar como inductores de IFN, aunque en el caso del virus de la gripe estos productos estarían presentes en el núcleo.

Para muchos virus, particularmente los Mononegavirales, se ha relacionado la presencia de DIs con la inducción de IFN (Baum & García-Sastre, 2010; Killip *et al.*, 2013; Strahle *et al.*, 2006). En el caso de los virus Sendai, PIV5 y VSV, los DIs tienen estructura *copy-back* y consecuentemente pueden formar dsRNA (Killip *et al.*, 2013; Perrault, 1976). Por el contrario, los DIs del virus de la gripe son estructuralmente idénticos al vRNA y también se empaquetan en forma de RNPs (**Figura In3B**) (Davis & Nayak, 1979; Davis *et al.*, 1980). Sin embargo, los datos obtenidos durante esta Tesis con los mutantes 18, 20 y 21 hacen pensar que la acumulación de RNA defectivos puede tener cierta implicación en la inducción de IFN, aunque no se puede excluir que además de empaquetar un posible exceso de estas RNPs (ver **apartado 4** de la Discusión), estos virus también porten otros tipos de RNAs, como RNAs desnudos o incompletos que puedan ser los que realmente induzcan la respuesta IFN.

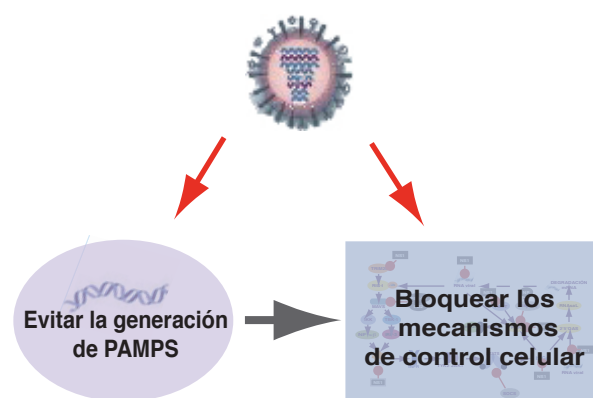


Figura D4. Esquema de los mecanismos generales que ha adoptado el virus de la gripe para evadir la respuesta IFN

De forma general los mecanismos que ha desarrollado el virus de la gripe para evadir la respuesta antiviral son: 1) evitar la generación de PAMPs que alerten al sistema IFN y 2) bloquear los mecanismos de control celulares.

6. La compleja interacción entre el virus de la gripe y la respuesta inmune innata celular

Los mutantes analizados durante esta Tesis pueden ser clasificados en dos grupos distintos atendiendo a su fenotipo: 1) Los virus que presentan mutaciones en NS1 (mutante 2 y 12) y tienen un fenotipo similar al mutante del NS1: inducen una fuerte respuesta IFN, tienen problemas en el bloqueo de la señalización de ISGs, replican peor en células MDCK y activan parcialmente la apoptosis en la célula infectada. 2) Los virus con mutaciones en las proteínas M1/M2 (mutantes 18, 20 y 21), que también inducen IFN, son incapaces de contrarrestar la acción de IFN exógeno, y acumulan grandes cantidades de RNAs defectivos. Se puede proponer que en el primer grupo las mutaciones afectan a los mecanismos de bloqueo que presenta el virus para contrarrestar la respuesta IFN, mientras que en el segundo, las mutaciones estimulan la inducción directa de IFN, probablemente por una gran acumulación de PAMPs desde etapas tempranas. Es curioso comprobar cómo mientras que el primer grupo induce fuertemente pIRF3 y parcialmente MxA y ISG56, el segundo induce fuertemente los ISGs pero tan sólo levemente la fosforilación de IRF3 (**Figuras R13 y R27**).

Teniendo esto en cuenta, y de forma simplificada, se pueden agrupar en dos (**Figura D4**) los 5 mecanismos que han desarrollado los virus para el control de la respuesta IFN y que se han descrito en la Introducción (**apartado 5.1**):

1. Evitar la generación de PAMPs que alerten al sistema IFN.
2. Bloquear los mecanismos de control celulares.

Todos los resultados apuntan a que el virus ha evolucionado dentro de su espacio de secuencias para replicar eficientemente en células competentes en la respuesta innata, pero que esta situación está lejos de ser idílica. Las soluciones que el virus puede encontrar dentro de su espacio de secuencia se encuentran sorprendentemente restringidas en prácticamente todos los genes por la enorme presión selectiva que supone el sistema IFN. La gran mayoría de los virus, incluido el de la gripe crecen mejor en un sistema sin IFN (Mordstein *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2003). Esto hace pensar que a pesar de la eficacia de los mecanismos generados por el virus para contrarrestar esta respuesta existe un equilibrio fruto de la co-evolución entre el virus y la célula a lo largo de los años. Muchas veces el resultado final depende del desarrollo temporal de ambos procesos. Que el virus sea capaz de replicar antes, o bien que un cierto retraso le de la ventaja a la célula, pueden determinar finalmente a qué lado se inclina la balanza. Los procesos biológicos no son totalmente perfectos, es posible pensar que algún fallo durante la replicación o en alguno de los mecanismos de bloqueo del virus puedan disparar la respuesta IFN. En este sentido son muy interesantes las observaciones del grupo de R. Randall (Chen *et al.*, 2010) indicando que sólo un pequeño número de las células infectadas en un cultivo dispara la respuesta IFN. Hay que tener en cuenta que las infecciones por gripe en la naturaleza comienzan con un número muy bajo de virus. Probablemente cuando estos “errores” ocurren y desencadenan una respuesta por parte del hospedador, la infección ya ha alcanzado un punto óptimo que permite la dispersión del virus. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos la infección puede ser controlada por parte del huésped evitando efectos muy negativos.

En esta Tesis se ha recreado una situación opuesta a lo que ocurre en la naturaleza. Se

ha eliminado la enorme presión selectiva que supone la respuesta IFN y se ha permitido al virus replicar durante varios ciclos en este nuevo ambiente. La hipótesis de partida es que en esta situación el virus puede mutar en aquellas posiciones de secuencia que antes estaban restringidas por la respuesta IFN hasta alcanzar una nueva situación óptima. Todo el genoma del virus evoluciona hasta encontrar un nuevo equilibrio en el que el virus replica mejor que el virus silvestre de partida. Esta nueva adaptación refleja la enorme restricción que supone el sistema IFN y la evolución que ha sufrido el virus para adaptarse al mismo.

7. Implicaciones de la respuesta innata en saltos de huésped y adaptación

Como se ha discutido, la respuesta IFN constituye una presión selectiva constante que obliga a los virus a mantener una eficacia adecuada de replicación y a bloquear esta respuesta de forma apropiada. Muchos de los mecanismos desarrollados por el virus para contrarrestar esta respuesta dependen directamente de las interacciones con proteínas y factores celulares que pueden tener un papel importante en la especificidad de huésped. No es sorprendente por tanto que el sistema IFN suponga una de las barreras más importantes que un virus necesita vencer para permitir el salto de hospedador. De hecho, y tal como se ha comentado antes (Introducción **apartado 6**), los virus humanos y aviares exhiben distintas susceptibilidades a la proteína antiviral de ratón (Mx1) y de humanos (MxA), que pueden explicar la diferente patogenicidad en cada hospedador.

En este sentido, cuando un virus aviar intenta replicar en humanos, aparte de las barreras que suponen el receptor, la eficiente replicación, etc., el virus tiene que lidiar con la respuesta IFN celular. En los casos de infecciones de humanos con virus aviares como el H5N1, se produce una respuesta inmunológica exacerbada, que en gran parte puede estar ocasionada por un mal bloqueo de la respuesta IFN por parte del virus. Se ha descrito que este tipo de virus inducen niveles superiores de citoquinas, incluido IFN, que los virus H3N2 y H1N1 en células humanas (revisado en Ramos & Fernandez-Sesma, 2012).

Estos virus normalmente no se transmiten bien, en parte quizás a esta limitación. En este sentido, tanto las cepas altamente patogénicas de H5N1 como el virus reconstruido de la pandemia de 1918, presentan una patología moderada en cerdos, a pesar de los altos niveles de replicación viral en el tracto respiratorio de este organismo, mientras que en humanos son consideradas muy virulentas (Van Haeften *et al.*, 2009). Resulta evidente que hace falta profundizar más en el papel que la respuesta IFN tienen en la adaptación a un nuevo huésped y los cambios que son necesarios para que un virus pueda evadir la respuesta IFN.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La utilización de dos estrategias diferentes como la mutagénesis al azar del segmento NS y los pases seriados en células con la respuesta IFN interrumpida (MDCK-V2) ha permitido generar una colección de mutantes virales que replican más eficientemente en células MDCK-V2 que en células MDCK, e inducen la expresión de IFN. De los resultados obtenidos se proponen las siguientes conclusiones:

1. La acumulación de mutaciones en posiciones muy conservadas en todos los segmentos indica que durante la replicación en células con el sistema innato funcional todo el genoma del virus está constreñido para contrarrestar la respuesta IFN.
2. Las mutaciones puntuales en la proteína NS1 (I64T en el mutante 2 y E172K en el mutante 12) inducen IFN de forma similar a un virus que carece de la proteína sin afectar a la replicación viral, sugiriendo que estos 2 residuos son importantes para contrarrestar la respuesta IFN.
3. Las mutaciones en las proteínas M1 y M2 presentes en los mutantes 18, 20 y 21 permiten la acumulación de grandes cantidades de RNAs defectivos que podrían ser responsables de la inducción de IFN causada por estos virus.
4. Los fenotipos de replicación y de interacción con el sistema de respuesta innata celular de los mutantes descritos sugiere que estas mutaciones podrían servir de base para la generación de cepas vacunales atenuadas.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Alonso-Caplen, F. V & Krug, R. M. (1991).** Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA. *Molecular and cellular biology* **11**, 1092–8.
- Alonso-Caplen, F. V, Nemeroff, M. E. & Krug, R. M. (1992).** Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes and Dev* **6**, 255–267.
- Aragón, T., De la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortín, J. & Nieto, A. (2000).** Translation factor eIF4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**, 6259–6268.
- Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T. & Shimotohno, K. (2007).** Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7500–5.
- Arnheiter, H., Frese, M., Kambadur, R., Meier, E. & Haller, O. (1996).** Mx transgenic mice--animal models of health. *Current topics in microbiology and immunology* **206**, 119–47.
- Arranz, R., Coloma, R., Chichon, F. J., Conesa, J. J., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Ortín, J. & Martín-Benito, J. (2012).** The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* **338**, 1634–1637.
- Avalos, R. T., Yu, Z. & Nayak, D. P. (1997).** Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *Journal of virology* **71**, 2947–58.

B

- Balachandran, S., Roberts, P. C., Kipperman, T., Bhalla, K. N., Compans, R. W., Archer, D. R. & Barber, G. N. (2000).** Alpha/Beta Interferons Potentiate Virus-Induced Apoptosis through Activation of the FADD/Caspase-8 Death Signaling Pathway. *Journal of Virology* **74**, 1513–1523.
- Bancroft, C. T. & Parslow, T. G. (2002).** Evidence for Segment-Nonspecific Packaging of the Influenza A Virus Genome **76**, 7133–7139.
- Baum, A. & García-Sastre, A. (2010).** Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino acids* **38**, 1283–99.
- Baum, A., Sachidanandam, R. & García-Sastre, A. (2010).** Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16303–8.
- Bergmann, M., García-Sastre, A., Carnero, E., Pehamberger, H., Wolff, K., Palese, P. & Muster, T. (2000).** Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *Journal of virology* **74**, 6203–6.
- Bornholdt, Z. a & Prasad, B. V. V. (2006).** X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nature structural & molecular biology* **13**, 559–60.
- Bornholdt, Z. a & Prasad, B. V. V. (2008).** X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Nature* **456**, 985–8.
- Borrego, B., Novella, I. S., Giralt, E., Andreu, D. & Domingo, E. (1993).** Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *Journal of virology* **67**, 6071–9.
- Bourmakina, S. V & García-Sastre, A. (2003).** Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *The Journal of general virology* **84**, 517–527. Soc General Microbiol.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. & Rey, F. A. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13034–13039.
- Briedis, D. J., Lamb, R. A. & Chopin, P. W. (1981a).** Influenza B virus RNA segment 8 codes for two nonstructural proteins. *Virology* **111**, 417–425.
- Briedis, D. J., Conti, G., Munn, E. A. & Mahy, B. W. J. (1981b).** Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cells. *Virology* **111**, 154–164.
- Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. (2003).** PABP1 and eIF4G1 associate to influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**, 3263–3274.
- Burleigh, L. M., Calder, L. J., Skehel, J. J. & Steinhauer, D. A. (2005).** Influenza A viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *Journal of virology* **79**, 1262–70.

C

- Carr, S. M., Carnero, E., García-Sastre, A., Brownlee, G. G. & Fodor, E. (2006).** Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology* **344**, 492–508.

- Cauthen, A. N., Swayne, D. E., Sekellick, M. J., Marcus, P. I. & Suarez, D. L. (2007).** Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *Journal of virology* **81**, 1838–47.
- Chen, B. J., Leser, G. P., Morita, E. & Lamb, R. A. (2007).** Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* **81**, 7111–7123.
- Chen, S., Short, J. a L., Young, D. F., Killip, M. J., Schneider, M., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2010).** Heterocellular induction of interferon by negative-sense RNA viruses. *Virology* **407**, 247–55. Elsevier Inc.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J. & other authors. (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306–1312.
- Chen, Z. & Krug, R. M. (2000).** Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends in microbiology* **8**, 376–83.
- Chen, Z., Li, Y. & Krug, R. M. (1999).** Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO journal* **18**, 2273–83.
- Chien, C. Y., Tejero, R., Huang, Y., Zimmerman, D. E., Ríos, C. B., Krug, R. M. & Montelione, G. T. (1997).** A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nature structural biology* **4**, 891–5.
- Chin, K. C. & Cresswell, P. (2001).** Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 15125–30.
- Civril, F., Bennett, M., Moldt, M., Deimling, T., Witte, G., Schiesser, S., Carell, T. & Hopfner, K.-P. (2011).** The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO reports* **12**, 1127–34.
- Clemens, M. J. & Elia, A. (1997).** The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* **17**, 503–524.
- Colman, P. M., Varghese, J. N. & Laver, W. G. (1983).** Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**, 41–44.
- Coloma, R., Valpuesta, J. M., Arranz, R., Carrascosa, J. L., Ortin, J. & Martin-Benito, J. (2009).** The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**, e1000491.
- Conenello, G. M., Zamarin, D., Perrone, L. A., Tumpey, T. & Palese, P. (2007).** A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS pathogens* **3**, 1414–21.
- Conenello, G. M., Tisoncik, J. R., Rosenzweig, E., Varga, Z. T., Palese, P. & Katze, M. G. (2011).** A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *Journal of virology* **85**, 652–62.
- Conti, G., Natali, A., Valcavi, P. & Schito, G. C. (1980).** [Phosphorylation of viral polypeptides in cells infected with influenza virus]. *Bollettino dell'Istituto sieroterapico milanese* **59**, 581–90.
- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2005).** An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**, 205–213.
- Cuddihy, A. R., Wong, A. H., Tam, N. W., Li, S. & Koromilas, A. E. (1999a).** The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* **18**, 2690–702.
- Cuddihy, A. R., Li, S., Tam, N. W. N., Wong, A. H.-T., Taya, Y., Abraham, N., Bell, J. C. & Koromilas, A. E. (1999b).** Double-Stranded-RNA-Activated Protein Kinase PKR Enhances Transcriptional Activation by Tumor Suppressor p53. *Mol Cell Biol* **19**, 2475–2484.
- Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K. K., Krug, A. & Hopfner, K. P. (2008).** The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* **29**, 169–179.

D

- D'Cunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R. J., Witt, P. L., Knight, E. & Borden, E. C. (1996).** In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **157**, 4100–8.
- Das, K., Ma, L.-C., Xiao, R., Radvansky, B., Aramini, J., Zhao, L., Marklund, J., Kuo, R.-L., Twu, K. Y. & other authors. (2008).** Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13093–8.
- Daumke, O., Gao, S., Von der Malsburg, A., Haller, O. & Kochs, G. (2010).** Structure of the MxA stalk elucidates the assembly of ring-like units of an antiviral module. *Small GTPases* **1**, 62–64.
- Davis, A. R. & Nayak, D. P. (1979).** Sequence relationships among defective interfering influenza viral RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 3092–6.

- Davis, A. R., Hiti, A. L. & Nayak, D. P. (1980).** Influenza defective interfering viral RNA is formed by internal deletion of genomic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 215–9.
- Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J. & Palese, P. (1980).** The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**, 315–328.
- Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A. & Pope, B. (1999).** Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *Journal of virology* **73**, 2222–31.
- Dittmann, J., Stertz, S., Grimm, D., Steel, J., García-Sastre, A., Haller, O. & Kochs, G. (2008).** Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *Journal of virology* **82**, 3624–31.
- Domingo, E. & Holland, J. J. (1992).** Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genetic engineering* **14**, 13–31.
- Domingo, E. & Holland, J. J. (1997).** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**, 151–178.
- Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T. & Weissmann, C. (1978).** Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**, 735–44.
- Drake, J. W. (1993).** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4171–5.
- Dudek, S. E., Wixler, L., Nordhoff, C., Nordmann, A., Anhlan, D., Wixler, V. & Ludwig, S. (2011).** The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biological chemistry* **392**, 1135–44.
- Duhaut, S. D. & McCauley, J. W. (1996).** Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**, 326–337.

E

- Egorov, a, Brandt, S., Sereinig, S., Romanova, J., Ferko, B., Katinger, D., Grassauer, a, Alexandrova, G., Katinger, H. & Muster, T. (1998).** Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *Journal of virology* **72**, 6437–41.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J. G., Schmolke, M. & Ludwig, S. (2007).** Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *Journal of virology* **81**, 3058–67.
- Eigen, M. (1971).** Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Die Naturwissenschaften* **58**, 465–523.
- Eigen, M. (1993).** Viral quasispecies. *Scientific American* **269**, 42–9.
- Enami, M. & Enami, K. (1996).** Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70**, 6653–6657.
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P. (1991).** An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**, 291–298.
- Esper, L., Codogno, P. & Biard-Piechaczyk, M. (2007).** Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **85**, 811–23.

F

- Falcón, A. M., Fortes, P., Marión, R. M., Beloso, A. & Ortín, J. (1999).** Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* **27**, 2241–2247.
- Falcón, A. M., Marión, R. M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A., Ortín, J., Falco, A. M., Mario, R. M. & other authors. (2004).** Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *Journal of virology* **78**, 3880–8.
- Fitzgerald, K. a. (2011).** The interferon inducible gene: Viperin. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**, 131–5.
- Fodor, E., Seong, B. L. & Brownlee, G. G. (1993).** Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74**, 1327–1333.
- Fodor, E., Pritlove, D. C. & Brownlee, G. G. (1994).** The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**, 4092–4096.

- Fortes, P., Beloso, a & Ortín, J. (1994).** Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO journal* **13**, 704–12.
- Fortes, P., Lamond, A. I. & Ortín, J. (1995).** Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *The Journal of general virology* **76** (Pt 4), 1001–7.
- Frese, M., Kochs, G., Feldmann, H., Hertkorn, C. & Haller, O. (1996).** Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *Journal of virology* **70**, 915–23.
- Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005).** Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**, 3766–3774.
- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. (2003).** Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2002–7.

G

- Gabriel, G., Herwig, A. & Klenk, H.-D. (2008).** Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS pathogens* **4**, e11.
- Gabriel, G., Klingel, K., Otte, A., Thiele, S., Hudjetz, B., Arman-Kalcek, G., Sauter, M., Shmidt, T., Rother, F. & other authors. (2011).** Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nature communications* **2**, 156.
- Gack, M. U., Shin, Y. C., Joo, C.-H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z. & other authors. (2007).** TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916–920.
- Gack, M. U., Albrecht, R. A., Urano, T., Inn, K.-S., Huang, I.-C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J. U. & García-Sastre, A. (2009).** Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell host & microbe* **5**, 439–49.
- Gaddy, D. F. & Lyles, D. S. (2007).** Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis via signaling through PKR, Fas, and Daxx. *Journal of virology* **81**, 2792–804.
- Galabru, J. & Hovanessian, A. (1987).** Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry* **262**, 15538–44.
- Gao, S., Von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O. (2010).** Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* **465**, 502–6.
- Gao, S., Von der Malsburg, A., Dick, A., Faelber, K., Schröder, G. F., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O. (2011).** Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity* **35**, 514–25.
- Garaigorta, U., Falcon, A. M. & Ortín, J. (2005).** Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**, 15246–15257.
- Garaigorta, U. (2007).** *Implicación de la proteína NS1 del virus de la gripe en la regulación de la expresión génica y en la morfogénesis viral.* Universidad Autónoma de Madrid.
- Garaigorta, U. & Ortín, J. (2007).** Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic acids research* **35**, 4573–82.
- García-Sastre, A. (2001).** Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* **279**, 375–384.
- García-Sastre, a, Egorov, a, Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P. & Muster, T. (1998).** Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324–30.
- García-Sastre, A. (2011).** Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus research* **162**, 12–8.
- Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. (1992).** Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**, 9383–9390.
- Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. (1993).** Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **268**, 22223–22226.
- Giannakopoulos, N. V., Luo, J.-K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D. J., Jacobs, B. S., Borden, E. C., Li, J., Virgin, H. W. & Zhang, D.-E. (2005).** Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochemical and biophysical research communications* **336**, 496–506.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. (1973).** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417–23.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. & Gibbs, A. J. (2001a).** Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 “Spanish flu”. *Science (New York, NY)* **293**, 1842–5.

- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. & Gibbs, A. J. (2001b).** The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of "Spanish flu" was a recombinant. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **356**, 1845–55.
- Gil, J., Alcamí, J. & Esteban, M. (1999).** Induction of Apoptosis by Double-Stranded-RNA-Dependent Protein Kinase (PKR) Involves the alpha Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **19**, 4653–4663.
- Le Goffic, R., Bouguyon, E., Chevalier, C., Vidic, J., Da Costa, B., Leymarie, O., Bourdieu, C., Decamps, L., Dhorne-Pollet, S. & Delmas, B. (2010).** Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **185**, 4812–23.
- Le Goffic, R., Leymarie, O., Chevalier, C., Rebours, E., Da Costa, B., Vidic, J., Descamps, D., Sallenave, J.-M., Rauch, M. & other authors. (2011).** Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein. *PLoS pathogens* **7**, e1002202.
- Gómez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E. & Portela, A. (1999).** Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80**, 1635–1645.
- Graef, K. M., Vreede, F. T., Lau, Y.-F., McCall, A. W., Carr, S. M., Subbarao, K. & Fodor, E. (2010).** The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *Journal of virology* **84**, 8433–45.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**, 59–74.
- Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., Koerner, I., Martínez-Sobrido, L., Solórzano, A., García-Sastre, A., Haller, O. & Kochs, G. (2007).** Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 6806–11.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R. W. H., Ortin, J. & other authors. (2008).** The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature structural & molecular biology* **15**, 500–6.
- Guo, Z., Chen, L., Zeng, H., Gomez, J. a, Plowden, J., Fujita, T., Katz, J. M., Donis, R. O. & Sambhara, S. (2007).** NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **36**, 263–9.

H

- Hale, B. G. & Randall, R. E. (2007).** PI3K signalling during influenza A virus infections. *Biochemical Society transactions* **35**, 186–7.
- Hale, B. G., Jackson, D., Chen, Y.-H., Lamb, R. a & Randall, R. E. (2006).** Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14194–9.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J. & Jackson, D. (2008).** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology* **89**, 2359–76.
- Hale, B. G., Kerry, P. S., Jackson, D., Precious, B. L., Gray, A., Killip, M. J., Randall, R. E. & Russell, R. J. (2010).** Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 1954–9.
- Haller, O., Frese, M., Rost, D., Nuttall, P. A. & Kochs, G. (1995).** Tick-borne thogoto virus infection in mice is inhibited by the orthomyxovirus resistance gene product Mx1. *Journal of virology* **69**, 2596–601.
- Hansen, J. L., Long, A. M. & Schultz, S. C. (1997).** Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**, 1109–1122.
- Haque, S. J. & Williams, B. R. (1994).** Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *The Journal of biological chemistry* **269**, 19523–9.
- Hatada, E. & Fukuda, R. (1992).** Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* **73**, 3325–3329.
- Hatada, E., Hasegawa, M., Shimizu, K., Hatanaka, M. & Fukuda, R. (1990).** Analysis of influenza A virus temperature-sensitive mutants with mutations in RNA segment 8. *J Gen Virol* **71**, 1283–1292.
- Hatada, E., Takizawa, T. & Fukuda, R. (1992).** Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol* **73**, 17–25.
- Hatada, E., Saito, S., Okishio, N. & Fukuda, R. (1997).** Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* **78**, 1059–1063.

- Hatada, E., Saito, S. & Fukuda, R. (1999).** Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *Journal of virology* **73**, 2425–33.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. (2001).** Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**, 1840–1842.
- Hay, A. J., Lomniczi, B., Bellamy, A. R. & Skehel, J. J. (1977).** Transcription of the influenza virus genome. *Virology* **83**, 337–355.
- Hayman, a, Comely, S., Lackenby, a, Hartgroves, L. C. S., Goodbourn, S., McCauley, J. W. & Barclay, W. S. (2007).** NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response. *Journal of virology* **81**, 2318–27.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A. & other authors. (2008).** Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**, 1123–1126.
- Helbig, K. J., Lau, D. T.-Y., Semendric, L., Harley, H. A. J. & Beard, M. R. (2005).** Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology (Baltimore, Md)* **42**, 702–10.
- Hilton, L., Moganeradj, K., Zhang, G., Chen, Y.-H., Randall, R. E., McCauley, J. W. & Goodbourn, S. (2006).** The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *Journal of virology* **80**, 11723–32.
- Van Hoeven, N., Belser, J. A., Szretter, K. J., Zeng, H., Staeheli, P., Swayne, D. E., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2009).** Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *Journal of virology* **83**, 2851–61.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, S., Nichol, S. & Vandepol, S. (1982).** Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577–1585.
- Holland, J. J., De la Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. (1992).** RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 1–20.
- Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1991).** Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**, 32–43.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K. & Ishihama, A. (1987).** Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J Biochem Tokyo* **102**, 1241–1249.
- Horisberger, M. A. (1995).** Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *American journal of respiratory and critical care medicine* **152**, S67–71.
- Horne, R. W., Waterson, A. P., Wildy, P. & Famham, A. E. (1960).** The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies on the structure of myxoviruses particles by negative staining techniques. *Virology*.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K. & other authors. (2006).** 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (New York, NY)* **314**, 994–7.
- Hoyle, L., Horne, R. W. & Waterson, A. P. (1961).** The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**, 448–59.
- Hsiang, T.-Y., Zhao, C. & Krug, R. M. (2009).** Interferon-induced ISG15 conjugation inhibits influenza A virus gene expression and replication in human cells. *Journal of virology* **83**, 5971–7.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. & Palese, P. (1987).** Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8140–4.
- Huang, A. S. (1977).** Viral pathogenesis and molecular biology. *Bacteriological reviews* **41**, 811–21.
- Hughey, P. G., Roberts, P. C., Holsinger, L. J., Zebedee, S. L., Lamb, R. A. & Compans, R. W. (1995).** Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology* **212**, 411–21.

I

- Illumina. (2007).** DNA Sequencing with Solexa Technology.
- Inglis, S. C. & Brown, C. M. (1981).** Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic acids research* **9**, 2727–40.
- Inglis, S. C., Carroll, A. R., Lamb, R. A. & Mahy, B. W. (1976).** Polypeptides specified by the influenza virus genome I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**, 489–503.
- Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M. & Almond, J. W. (1979).** The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 3790–4.

- Ito, T., Yang, M. & May, W. S. (1999).** RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *The Journal of biological chemistry* **274**, 15427–32.
- Iwai, A., Shiozaki, T., Kawai, T., Akira, S., Kawaoka, Y., Takada, A., Kida, H. & Miyazaki, T. (2010).** Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon beta promoter stimulator 1. *The Journal of biological chemistry* **285**, 32064–74.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K. & Kawaoka, Y. (2006).** The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *Journal of virology* **80**, 5233–40.
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K., Wills, N. M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, a & other authors. (2012).** An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science* **199**, 1–9. American Association for the Advancement of Science.

J

- Janda, J. M. & Nayak, D. P. (1979).** Defective influenza viral ribonucleoproteins cause interference. *Journal of virology* **32**, 697–702.
- Jia, D., Rahbar, R., Chan, R. W. Y., Lee, S. M. Y., Chan, M. C. W., Wang, B. X., Baker, D. P., Sun, B., Peiris, J. S. M. & other authors. (2010).** Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PloS one* **5**, e13927.
- Jiang, F., Ramanathan, A., Miller, M. T., Tang, G.-Q., Gale, M., Patel, S. S. & Marcotrigiano, J. (2011).** Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* **479**, 423–7.
- Jin, H. K., Yoshimatsu, K., Takada, A., Ogino, M., Asano, A., Arikawa, J. & Watanabe, T. (2001).** Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Archives of virology* **146**, 41–9.

K

- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T. & other authors. (2006).** Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101–5.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005).** IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology* **6**, 981–8.
- Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. (1989).** Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *Journal of virology* **63**, 4603–8.
- Kennedy, S. I. (1976).** Sequence relationships between the genome and the intracellular RNA species of standard and defective-interfering Semliki Forest virus. *Journal of molecular biology* **108**, 491–511.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M. (2006).** Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 159–80.
- Kilbourne, E. D. (2006).** Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging infectious diseases* **12**, 9–14.
- Killip, M. J., Young, D. F., Ross, C. S., Chen, S., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2011).** Failure to activate the IFN- β promoter by a paramyxovirus lacking an interferon antagonist. *Virology* **415**, 39–46.
- Killip, M. J., Young, D. F., Gatherer, D., Ross, C. S., Short, J., Davison, A. J., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2013).** Deep sequencing analysis of defective genomes of parainfluenza virus 5 and their role in interferon induction. *Journal of virology* **87**, 4798–807.
- Klumpp, K., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (1997).** Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *The EMBO journal* **16**, 1248–57.
- Kochs, G. & Haller, O. (1999).** Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2082–6.
- Kochs, G., García-Sastre, A. & Martínez-Sobrido, L. (2007a).** Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology* **81**, 7011–21.
- Kochs, G., Koerner, I., Thiel, L., Kothlow, S., Kaspers, B., Ruggli, N., Summerfield, A., Pavlovic, J., Stech, J. & Staeheli, P. (2007b).** Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *The Journal of general virology* **88**, 1403–9.
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A. A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D. & Cusack, S. (2011).** Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* **147**, 423–35.
- Krug, R. M., Broni, B. A. & Bouloy, M. (1979).** Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**, 329–34.

- Krug, R. M., Alonso-Caplan, F. V., Julkunen, I. & Katze, M. G. (1989).** Expression and replication of the influenza virus genome. *Plenum Press* pp 89–152.
- Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L. & Latham, A. G. (2003).** Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* **309**, 181–189.
- Kujime, K., Hashimoto, S., Gon, Y., Shimizu, K. & Horie, T. (2000).** p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **164**, 3222–8.

L

- De la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A. & Ortín, J. (1995).** Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**, 2427–2433.
- Lai, J. C. C., Chan, W. W. L., Kien, F., Nicholls, J. M., Peiris, J. S. M. & Garcia, J.-M. (2010).** Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase. *The Journal of general virology* **91**, 2322–30.
- Lamb, R. A. & Choppin, P. W. (1979).** Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4908–12.
- Lamb, R. A. & Lai, C. J. (1981).** Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and an open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains. *Virology* **112**, 746–51.
- Lamb, R. A., Choppin, P. W., Chanock, R. M. & Lai, C. J. (1980).** Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 1857–61.
- Lamb, R. A., Lai, C. J. & Choppin, P. W. (1981).** Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 4170–4.
- Latham, T. & Galarza, J. M. (2001).** Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *Journal of virology* **75**, 6154–65.
- Lauring, A. S. & Andino, R. (2010).** Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS pathogens* **6**, e1001005.
- Lee, T. G., Tang, N., Thompson, S., Miller, J. & Katze, M. G. (1994).** The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Molecular and cellular biology* **14**, 2331–42.
- Lenard, J. & Compans, R. W. (1975).** Polypeptide composition of incomplete influenza virus grown in MDBK cells. *Virology* **65**, 418–26.
- Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R. E. & other authors. (2007).** IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1371–6.
- Li, H. & Durbin, R. (2009).** Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1754–60.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R. (2009).** The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 2078–9.
- Li, S., Min, J.-Y., Krug, R. M. & Sen, G. C. (2006).** Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* **349**, 13–21.
- Li, X., Leung, S., Qureshi, S., Darnell, J. E. & Stark, G. R. (1996).** Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *The Journal of biological chemistry* **271**, 5790–4.
- Li, Y., Chen, Z. Y., Wang, W., Baker, C. C. & Krug, R. M. (2001).** The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA (New York, NY)* **7**, 920–31.
- Liang, Y., Huang, T., Ly, H., Parslow, T. G. & Liang, Y. (2008).** Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *Journal of virology* **82**, 229–36.
- Liang, Y., Hong, Y. & Parslow, T. G. (2005).** cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *Journal of virology* **79**, 10348–55.
- Lin, C., Zimmer, S. G., Lu, Z., Holland, R. E., Dong, Q. & Chambers, T. M. (2001).** The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology* **287**, 202–13.
- Lin, D., Lan, J. & Zhang, Z. (2007).** Structure and Function of the NS1 Protein of Influenza A Virus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **39**, 155–162.

- Lin, R., Yang, L., Nakhaei, P., Sun, Q., Sharif-Askari, E., Julkunen, I. & Hiscott, J. (2006). Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *The Journal of biological chemistry* **281**, 2095–103.
- Liu, J., Lynch, P. A., Chien, C. Y., Montelione, G. T., Krug, R. M. & Berman, H. M. (1997). Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nature structural biology* **4**, 896–9.
- Liu, T., Muller, J. & Ye, Z. (2002). Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology. *Virology* **304**, 89–96.
- López-Turiso, J. A. & Ortín, J. (1988). Transfection of MDCK cells with influenza virus ribonucleoprotein complexes. *Microbiología (Madrid, Spain)* **4**, 167–75.
- Lu, G., Reinert, J. T., Pitha-Rowe, I., Okumura, A., Kellum, M., Knobeloch, K. P., Hassel, B. & Pitha, P. M. (2006). ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **52**, 29–41.
- Lu, Y., Qian, X. Y. & Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes & development* **8**, 1817–28.
- Ludwig, S., Ehrhardt, C., Neumeier, E. R., Kracht, M., Rapp, U. R. & Pleschka, S. (2001). Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **276**, 10990–8.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garci, A., Heins, G. & Wolff, T. (2002). The Influenza A Virus NS1 Protein Inhibits Activation of Jun N-Terminal Kinase and AP-1 Transcription Factors **76**, 11166–11171.
- Luo, D., Ding, S. C., Vela, A., Kohlway, A., Lindenbach, B. D. & Pyle, A. M. (2011). Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* **147**, 409–22.
- Luo, G. X., Luytjes, W., Enami, M. & Palese, P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *Journal of virology* **65**, 2861–7.

M

- Madin, S. H. & Darby, N. B. (1958). Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **98**, 574–6.
- Von Magnus, P. (1951). Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. II. The formation of incomplete virus following inoculation of large doses of seed virus. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **28**, 278–93.
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M. & Silverman, R. H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816–9.
- Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of virology* **69**, 5087–94.
- Marcus, P. I. (1983). Interferon induction by viruses: one molecule of dsRNA as the threshold for interferon induction. *Interferon* **5**, 115–80.
- Marcus, P. I. & Sekellick, M. J. (1977). Defective interfering particles with covalently linked [+/-]RNA induce interferon. *Nature* **266**, 815–9.
- Marcus, P. I., Rojek, J. M. & Sekellick, M. J. (2005). Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses. *Journal of virology* **79**, 2880–90.
- Marión, R. M., Aragón, T., Beloso, a, Nieto, a & Ortín, J. (1997a). The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic acids research* **25**, 4271–7.
- Marión, R. M., Zürcher, T., De la Luna, S. & Ortín, J. (1997b). Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *The Journal of general virology* **78** (Pt 10), 2447–51.
- Martín-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortín, J. (2001). Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO reports* **2**, 313–7.
- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *The Journal of cell biology* **91**, 601–13.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W. & McCullers, J. A. (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell host & microbe* **2**, 240–9.

- McAuley, J. L., Chipuk, J. E., Boyd, K. L., Van De Velde, N., Green, D. R. & McCullers, J. A. (2010).** PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS pathogens* **6**, e1001014.
- McCown, M. F. & Pekosz, A. (2006).** Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *Journal of virology* **80**, 8178–89.
- Melén, K. & Julkunen, I. (1997).** Nuclear cotransport mechanism of cytoplasmic human MxB protein. *The Journal of biological chemistry* **272**, 32353–9.
- Melville, M. W., Tan, S. L., Wambach, M., Song, J., Morimoto, R. I. & Katze, M. G. (1999).** The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *The Journal of biological chemistry* **274**, 3797–803.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005).** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–72.
- Mibayashi, M., Martínez-Sobrido, L., Loo, Y.-M., Cárdenas, W. B., Gale, M. & García-Sastre, A. (2007).** Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of virology* **81**, 514–24.
- Min, J.-Y. & Krug, R. M. (2006).** The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7100–5.
- Min, J.-Y., Li, S., Sen, G. C. & Krug, R. M. (2007).** A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* **363**, 236–43.
- Modrich, P. & Lahue, R. (1996).** Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual review of biochemistry* **65**, 101–33.
- Moore, T. C., Al-Salleeh, F. M., Brown, D. M. & Petro, T. M. (2011).** IRF3 polymorphisms induce different innate anti-Theiler's virus immune responses in RAW264.7 macrophages. *Virology* **418**, 40–8.
- Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Paludan, S. R., Klucher, K. & Staeheli, P. (2008).** Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS pathogens* **4**, e1000151.
- Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H. & Kawaoka, Y. (2006).** Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *Journal of virology* **80**, 2318–25.
- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. (2013).** Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of virology* **87**, 2455–62.
- Nallagatla, S. R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C. E. & Bevilacqua, P. C. (2007).** 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science (New York, NY)* **318**, 1455–8.

N

- Nayak, D. P. (1969).** Influenza virus: structure, replication and defectiveness. *Federation proceedings* **28**, 1858–66.
- Nayak, D. P., Tobita, K., Janda, J. M., Davis, A. R. & De, B. K. (1978).** Homologous interference mediated by defective interfering influenza virus derived from a temperature-sensitive mutant of influenza virus. *Journal of virology* **28**, 375–86.
- Nayak, D. P., Sivasubramanian, N., Davis, A. R., Cortini, R. & Sung, J. (1982).** Complete sequence analyses show that two defective interfering influenza viral RNAs contain a single internal deletion of a polymerase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2216–20.
- Nayak, D. P., Hui, E. K.-W. & Barman, S. (2004).** Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* **106**, 147–65.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R. M. (1998).** Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular cell* **1**, 991–1000.
- Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R. & other authors. (1999).** Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9345–50.
- Nicholls, J. M., Chan, R. W. Y., Russell, R. J., Air, G. M. & Peiris, J. S. M. (2008).** Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends in microbiology* **16**, 149–57.
- Noah, D. L., Twu, K. Y. & Krug, R. M. (2003).** Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology* **307**, 386–395.

- Noda, T. & Kawaoka, Y. (2010).** Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions 380–391.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H. & Kawaoka, Y. (2006).** Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490–2.
- Noton, S. L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A. E., Elton, D. & Digard, P. (2007).** Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *The Journal of general virology* **88**, 2280–90.

O

- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. & Moroianu, J. (1995).** Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *The Journal of biological chemistry* **270**, 22701–4.
- O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. (1998).** The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal* **17**, 288–96.
- Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J. R. H. & Park, S.-Y. (2008).** The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**, 1127–31.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttrop, N. & Wolff, T. (2007).** IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular microbiology* **9**, 930–8.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. & Seya, T. (2009).** Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *The Journal of biological chemistry* **284**, 807–17.
- Oshiumi, H., Miyashita, M., Inoue, N., Okabe, M., Matsumoto, M. & Seya, T. (2010).** The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host & microbe* **8**, 496–509.
- Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Goto, H., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2009).** Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *Journal of virology* **83**, 3384–8.

P

- Palese, P. & Shaw, M. W. (2007).** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology 5th edition*, 5th edn., pp. 1647–1689. Edited by D. Knipe & Howley PM.
- Park, Y. W. & Katze, M. G. (1995).** Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *The Journal of biological chemistry* **270**, 28433–9.
- Patel, C. V., Handy, I., Goldsmith, T. & Patel, R. C. (2000).** PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *The Journal of biological chemistry* **275**, 37993–8.
- Patel, R. C. & Sen, G. C. (1998).** Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Molecular and cellular biology* **18**, 7009–19.
- Pauli, E.-K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J. G. & Ludwig, S. (2008).** Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- κ B-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS pathogens* **4**, e1000196.
- Pavlovic, J., Zürcher, T., Haller, O. & Staeheli, P. (1990).** Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *Journal of virology* **64**, 3370–5.
- Pavlovic, J., Haller, O. & Staeheli, P. (1992).** Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of virology* **66**, 2564–9.
- Perales, B., De la Luna, S., Palacios, I. & Ortín, J. (1996).** Mutational analysis identifies functional domains in the influenza A virus PB2 polymerase subunit. *Journal of virology* **70**, 1678–86.
- Perrault, J. (1976).** Cross-linked double-stranded RNA from a defective vesicular stomatitis virus particle. *Virology* **70**, 360–71.
- Petri, T., Patterson, S. & Dimmock, N. J. (1982).** Polymorphism of the NS1 proteins of type A influenza virus. *The Journal of general virology* **61** (Pt 2), 217–31.

- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Näslund, T. I., Liljeström, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. (2006).** RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, NY)* **314**, 997–1001.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1992).** Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517–28.
- Poon, L. L., Pritlove, D. C., Sharps, J. & Brownlee, G. G. (1998).** The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *Journal of virology* **72**, 8214–9.
- Poon, L. L., Pritlove, D. C., Fodor, E. & Brownlee, G. G. (1999).** Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *Journal of virology* **73**, 3473–6.
- Pothlichet, J., Chignard, M. & Si-Tahar, M. (2008).** Cutting Edge: Innate Immune Response Triggered by Influenza A Virus Is Negatively Regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-Dependent Pathway. *J Immunol* **180**, 2034–2038.
- Precious, B., Young, D. F., Andrejeva, L., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2005).** In vitro and in vivo specificity of ubiquitination and degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of the paramyxoviruses simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2. *The Journal of general virology* **86**, 151–8.
- Privalsky, M. L. & Penhoet, E. E. (1981).** The structure and synthesis of influenza virus phosphoproteins. *The Journal of biological chemistry* **256**, 5368–76.

Q

- Qian, X. Y., Chien, C. Y., Lu, Y., Montelione, G. T. & Krug, R. M. (1995).** An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *RNA (New York, NY)* **1**, 948–56.
- Qiu, Y. & Krug, R. M. (1994).** The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *Journal of virology* **68**, 2425–32.
- Qiu, Y., Nemeroff, M. & Krug, R. M. (1995).** The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA (New York, NY)* **1**, 304–16.

R

- Rajsbaum, R., Albrecht, R. A., Wang, M. K., Maharaj, N. P., Versteeg, G. A., Nistal-Villán, E., García-Sastre, A. & Gack, M. U. (2012).** Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein. *PLoS pathogens* **8**, e1003059.
- Ramos, I. & Fernandez-Sesma, A. (2012).** Innate Immunity to H5N1 Influenza Viruses in Humans. *Viruses* **4**, 3363–3388.
- Randall, R. E. & Goodbourn, S. (2008).** Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of general virology* **89**, 1–47.
- Rehwinkel, J. (2010).** Exposing viruses: RNA patterns sensed by RIG-I-like receptors. *Journal of clinical immunology* **30**, 491–5.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W. & other authors. (2010).** RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**, 397–408.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Zamarreño, N., Fernández, Y., Juárez, S. & Ortín, J. (2008).** The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PloS one* **3**, e3904.
- Richardson, J. C. & Akkina, R. K. (1991).** NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Archives of virology* **116**, 69–80.
- Robb, N. C. & Fodor, E. (2012).** The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein. *The Journal of general virology* **93**, 113–8.
- Robb, N. C., Jackson, D., Vreede, F. T. & Fodor, E. (2010).** Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein. *The Journal of general virology* **91**, 2331–40.
- Roberts, P. C. & Compans, R. W. (1998).** Host cell dependence of viral morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5746–5751. The National Academy of Sciences.
- Robertson, J. S. (1979).** 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic acids research* **6**, 3745–57.

- Rose, J. K., Buonocore, L. & Whitt, M. A. (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques* **10**, 520–5.
- Rossman, J. S. & Lamb, R. a. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**, 229–36. Elsevier Inc.
- Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., Balannik, V., Pinto, L. H. & Lamb, R. a. (2010). Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *Journal of Virology* **84**, 5078–5088. American Society for Microbiology (ASM).

S

- Salvatore, M., Basler, C. F., Parisien, J., Horvath, C. M., Bourmakina, S., Zheng, H., Muster, T. & Palese, P. (2002). Effects of Influenza A Virus NS1 Protein on Protein Expression : the NS1 Protein Enhances Translation and Is Not Required for Shutoff of Host Protein Synthesis **76**, 1206–1212.
- Satterly, N., Tsai, P.-L., Van Deursen, J., Nussenzveig, D. R., Wang, Y., Faria, P. a, Levay, A., Levy, D. E. & Fontoura, B. M. a. (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1853–8.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T. & Simons, K. (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **274**, 2038–44.
- Scheuner, D., Patel, R., Wang, F., Lee, K., Kumar, K., Wu, J., Nilsson, A., Karin, M. & Kaufman, R. J. (2006). Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **281**, 21458–68.
- Schmolke, M. & García-Sastre, A. (2010). Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus. *Cellular microbiology* **12**, 873–80.
- Schmolke, M., Manicassamy, B., Pena, L., Sutton, T., Hai, R., Varga, Z. T., Hale, B. G., Steel, J., Pérez, D. R. & García-Sastre, A. (2011). Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS pathogens* **7**, e1002186.
- Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., McGregor, M. & Hinshaw, V. S. (1998). Mink lung epithelial cells: unique cell line that supports influenza A and B virus replication. *Journal of clinical microbiology* **36**, 3718–20.
- Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoka, Y. & Hinshaw, V. S. (2001). Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *Journal of virology* **75**, 7875–81.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–82.
- Shapira, S. D., Gat-Viks, I., Shum, B. O. V, Dricot, A., De Grace, M. M., Wu, L., Gupta, P. B., Hao, T., Silver, S. J. & other authors. (2009). A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* **139**, 1255–67.
- Shapiro, G. I., Gurney, T. & Krug, R. M. (1987). Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *Journal of virology* **61**, 764–73.
- Sharma, K., Tripathi, S., Ranjan, P., Kumar, P., Garten, R., Deyde, V., Katz, J. M., Cox, N. J., Lal, R. B. & other authors. (2011). Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation. *PloS one* **6**, e20215.
- Shih, S. R., Nemeroff, M. E. & Krug, R. M. (1995). The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6324–8.
- Shin, Y.-K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. a & Zhou, Y. (2007). Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *The Journal of general virology* **88**, 13–8.
- Shope, R. E. (1931). SWINE INFLUENZA : III. FILTRATION EXPERIMENTS AND ETIOLOGY. *The Journal of experimental medicine* **54**, 373–85.
- Simpson-Holley, M., Ellis, D., Fisher, D., Elton, D., McCauley, J. & Digard, P. (2002). A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**, 212–25.
- Skehel, J. J., Bizebard, T., Bullough, P. A., Hughson, F. M., Knossow, M., Steinhauer, D. A., Wharton, S. A. & Wiley, D. C. (1995). Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **60**, 573–80.
- Smith, D. B. & Inglis, S. C. (1985). Regulated production of **4**, 2313–2319.
- Smith, G. L. & Hay, A. J. (1982). Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**, 96–108.
- Smith, W., Andrewes, C. H. & Laidlaw, P. P. (1933). A virus obtained from influenza patients. *Lancet* **1**, 66–68.
- Solórzano, A., Webby, R. J., Lager, K. M., Janke, B. H., García-Sastre, A. & Richt, J. A. (2005). Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *Journal of virology* **79**, 7535–43.

- Srivastava, S. P., Kumar, K. U. & Kaufman, R. J. (1998).** Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 2416–23.
- Stegmann, T., Booy, F. P. & Wilschut, J. (1987a).** Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *The Journal of biological chemistry* **262**, 17744–9.
- Stegmann, T., Morselt, H. W., Scholma, J. & Wilschut, J. (1987b).** Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochimica et biophysica acta* **904**, 165–70.
- Strahle, L., Garcin, D. & Kolakofsky, D. (2006).** Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* **351**, 101–11.
- Stranden, A. M., Staeheli, P. & Pavlovic, J. (1993).** Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology* **197**, 642–51.
- Suárez, P., Valcárcel, J. & Ortín, J. (1992).** Heterogeneity of the mutation rates of influenza A viruses: isolation of mutator mutants. *Journal of virology* **66**, 2491–4.

T

- Takahasi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Inagaki, F. & Fujita, T. (2008).** Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular Cell* **29**, 428–440.
- Tallóczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Eskelinen, E.-L. & Levine, B. (2002).** Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 190–5.
- Tan, S. L. & Katze, M. G. (1998).** Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **18**, 757–66.
- Tang, Y., Zhong, G., Zhu, L., Liu, X., Shan, Y., Feng, H., Bu, Z., Chen, H. & Wang, C. (2010).** Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **184**, 5777–90.
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P. J., Bougault, C. M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R. W. H., Daigle, N. & other authors. (2007).** Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nature structural & molecular biology* **14**, 229–33.
- Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T. & Krystal, M. (1994).** Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *Journal of virology* **68**, 5108–16.
- Twu, K. Y., Noah, D. L., Rao, P., Kuo, R.-L. & Krug, R. M. (2006).** The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *Journal of virology* **80**, 3957–65.
- Twu, K. Y., Kuo, R.-L., Marklund, J. & Krug, R. M. (2007).** The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *Journal of virology* **81**, 8112–21.

V

- Valcárcel, J., Portela, J. & Ortín, J. (1991).** Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *The Journal of general virology* **72** (Pt 6), 1301–8.
- Valentino, L. & Pierre, J. (2006).** JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical pharmacology* **71**, 713–21.
- Varga, Z. T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A. & Palese, P. (2011).** The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS pathogens* **7**, e1002067.
- Varghese, J. N., Laver, W. G. & Colman, P. M. (1983).** Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**, 35–40.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. (2006).** Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344–8.

W

- Wang, W. & Krug, R. M. (1998).** U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein. *RNA (New York, NY)* **4**, 55–64.

- Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C. Y., Montelione, G. T. & Krug, R. M. (1999).** RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA (New York, NY)* **5**, 195–205.
- Wang, X., Hinson, E. R. & Cresswell, P. (2007).** The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell host & microbe* **2**, 96–105.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988).** Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426–31.
- Van Wielink, R., Harmsen, M. M., Martens, D. E., Peeters, B. P. H., Wijffels, R. H. & Moormann, R. J. M. (2012).** Mutations in the M-gene segment can substantially increase replication efficiency of NS1 deletion influenza A virus in MDCK cells. *Journal of virology* **86**, 12341–50.
- Wigler, M., Sweet, R., Sim, G. K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S. & Axel, R. (1979).** Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* **16**, 777–85.
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. & Digard, P. (2009).** A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of virology* **83**, 8021–31.
- Wolff, T. & Ludwig, S. (2009).** Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **29**, 549–57.

X

- Xia, S., Monzingo, A. F. & Robertus, J. D. (2009).** Structure of NS1A effector domain from the influenza A/Udorn/72 virus. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **65**, 11–7.
- Xu, L.-G., Wang, Y.-Y., Han, K.-J., Li, L.-Y., Zhai, Z. & Shu, H.-B. (2005).** VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular cell* **19**, 727–40.

Y

- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M. & other authors. (2006).** Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**, 378–82.
- Yángüez, E. & Nieto, A. (2011).** So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus research* **156**, 1–12.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. & Ishihama, A. (1993).** Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**, 249–55.
- Ye, Z. P., Pal, R., Fox, J. W. & Wagner, R. R. (1987).** Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *Journal of virology* **61**, 239–46.
- Yin, C., Khan, J. a, Swapna, G. V. T., Ertekin, A., Krug, R. M., Tong, L. & Montelione, G. T. (2007).** Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *The Journal of biological chemistry* **282**, 20584–92.
- Yoshida, T., Shaw, M. W., Young, J. F. & Compans, R. W. (1981).** Characterization of the RNA associated with influenza A cytoplasmic inclusions and the interaction of NS1 protein with RNA. *Virology* **110**, 87–97.
- Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. (2007).** SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews Immunology* **7**, 454–65.
- Young, D. F., Andrejeva, L., Livingstone, A., Goodbourn, S., Lamb, R. A., Collins, P. L., Elliott, R. M. & Randall, R. E. (2003).** Virus Replication in Engineered Human Cells That Do Not Respond to Interferons **77**, 2174–2181.
- Young, R. J. & Content, J. (1971).** 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nature: New biology* **230**, 140–2.

Z

- Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. (2005).** Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS pathogens* **1**, e4.
- Zhang, J., Leser, G. P., Pekosz, A. & Lamb, R. A. (2000).** The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging. *Virology* **269**, 325–34.
- Zhang, P. & Samuel, C. E. (2007).** Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *Journal of virology* **81**, 8192–200.

- Zhao, C. (2005).** Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 10200–10205.
- Zhao, C., Hsiang, T.-Y., Kuo, R.-L. & Krug, R. M. (2010).** ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2253–8.
- Zhirnov, O. P. & Klenk, H.-D. (2007).** Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **12**, 1419–32.
- Zimmermann, P., Mänz, B., Haller, O., Schwemmle, M. & Kochs, G. (2011).** The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *Journal of virology* **85**, 8133–40.

Anexo 1

Tabla de oligonucleótidos

Tabla de oligonucleótidos

Mutagénesis dirigida para rescatar mutantes puntuales genoteca	
NS1 E172K FOWARD	5' CCAGGACATACTATTAGGATGTCAAAAATGC 3'
NS1 E172K REW	5' GCATTTTGTGACATCCTTAATAGTATGTCCTGG 3'
NS1 I68T FOWARD	5' CAGATAGTAGAGAAGACTCTGAAGGAAGAATC 3'
NS1 I68T REW	5' GATTCTTCCTTCAGAGTCTTCTCTACTATCTG 3'
Mutagénesis dirigida para rescatar mutantes puntuales pases seriados	
NS1 I64T FOWARD	5' CATGTTGGAAAGCAGACAGTAGAGAAGATTCT 3'
NS1 I64T REW	5' AGAATCTTCTCTACTGTCTGCTTCCAACATG 3'
M1 I115M FOWARD	5' GGGGCCAAAGAAATGGCACTCAGTTATTCTG 3'
M1 I115M REW	5' CAGAATAACTGAGTGCCATTCTTTGGCCCC 3'
M1 D30N FOWARD	5' GCGCAGAGACTTGAAATATGTCTTGTCTGGAA 3'
M1 D30N REW	5' TTCCAGCAAAGACATTTTCAAGTCTCTGCGC 3'
M2 A86S FOWARD	5' CAGAGTGCTGTGGATTCTGACGACAGTCATT 3'
M2 A86S REW	5' AATGACTGTCGTCAGATCCACAGCACTCTG 3'
PCRs mutagénica para la generación de la genoteca	
5' TERM NS(+)	5' AGCAAAAGCAGGGTGACAAA 3'
3' TERM NS(-)	5' ACAAGGGTGT'TTTTATCAT 3'
BSMBNS-5V	5' GTCACGTCTCATATTAGTAGAAACAAGGGTGT'TTTTATC 3'
BSMSNS-3V	5' CTGACGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTGACAAAGAC 3'
Secuenciación de plásmidos	
pHH directo	5' AAAAAAAAAACAAAGTTTCGCC 3'
pHH reverso	5' CCTTCGGTGCCCTCGTGTGT 3'
seq extr M3' mRNA	5' TGCAGGCAATGAGAGCCATTGG 3'
RT-PCRs cDNAs	
BSMBNS-5V	5' GTCACGTCTCATATTAGTAGAAACAAGGGTGT'TTTTATC 3'
PB2 cRNA	5' AGCAAAAGCAGGTCAATTATATCAATATG 3'
PB1 cRNA 5'	5' CAAAAGCAGGCAAACCATTTGAA 3'
PA cRNA 5'	5' GCAAAAGCAGGTACTGATTTCGAGA 3'
M cRNA 5'	5' AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATG 3'
NS cRNA 5'	5' CAAAAGCAGGGTGACAAAGACATA 3'
Comprobación DIs	
PB2 fusion DIs 1872	5' TCCGGATGTGCTTTAATTGGATATTTCA 3'
PB1 fusion DIs 1886	5' TTGTGTTGAGAATTCTGTTGACTGTGT 3'
PB1 fusion DIs 1939	5' ATCTGTTTCATCCTCATCCTGTTCTCTGT 3'
PA fusion DIs 1794	5' CAGGCTATTGAATACATGAAACATACCTC 3'
PB1 fusión DIs 108 extm	5' TTGAACGACTTCCATCGTTTCAAGG 3'

Anexo 2

Esquemas de deleciones encontradas en mutantes

Esquemas de deleciones encontradas en mutantes

Representación esquemática de las deleciones encontradas de los diferentes mutantes. Están representadas aquellas deleciones con una longitud mínima de 15nt y que aparecen al menos 5 veces. Se indica el número de copias (Reads), el punto de comienzo (Start) y finalización (End) de la delección, y el tamaño final (Size).

Si se desea profundizar más en los datos, en el CD adjunto hay información adicional de las secuencias. En el mismo se incluyen los datos globales de secuencia y un visualizador interactivo de las deleciones.

Mutante WT PB2

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante WT PB1

Reads Start End Size

	x5	140	194	53
--	----	-----	-----	----

Mutante WT PA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante WT HA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante WT NP

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante WT NA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante WT M

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante WT NS

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante 2 PB2

Reads Start End Size

No Encontrado


Mutante 2 PB1

Reads Start End Size

	x8	307	1960	1652
	x5	308	1961	1652

Mutante 2 PA

Reads Start End Size

	x5	214	1925	1710
	x11	148	1912	1763
	x5	149	1913	1763

Mutante 2 HA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante 2 NP

Reads Start End Size

No Encontrado


Mutante 2 NA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante 2 M

Reads Start End Size

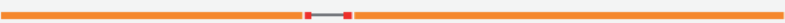

	x5	51	740	688
---	----	----	-----	-----

Mutante 2 NS

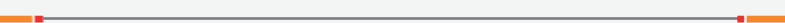

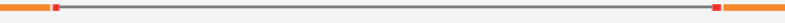

Reads Start End Size

	x13	53	526	472
	x20	49	522	472


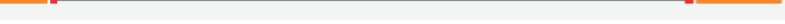
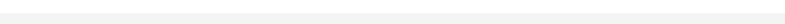
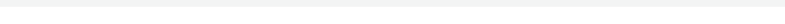

Mutante 14 PB2

	Reads	Start	End	Size
	x8	928	1024	95
	x5	924	1020	95

Mutante 14 PB1

	Reads	Start	End	Size
	x11	130	2188	2057
	x16	177	2113	1935
	x6	178	2114	1935
	x5	744	1614	869

Mutante 14 PA

	Reads	Start	End	Size
	x39	163	1956	1792
	x46	164	1957	1792
	x5	189	1997	1807
	x28	228	1991	1762
	x14	232	1995	1762

Mutante 14 HA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 14 NP

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 14 NA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

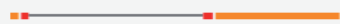
No Encontrado

Mutante 14 M

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 14 NS

	Reads	Start	End	Size
	x5	49	522	472



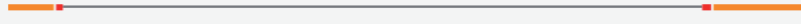

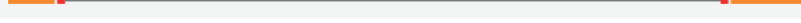
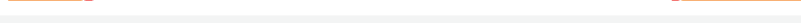
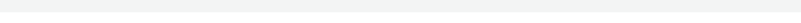
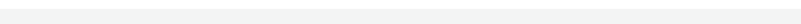
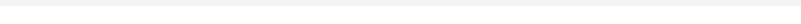
Mutante 17 PB2

Reads Start End Size

No Encontrado

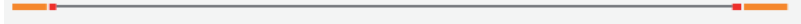

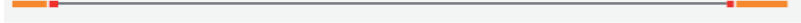
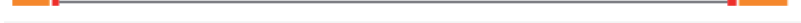
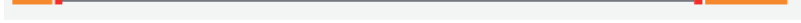
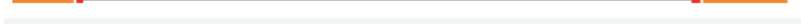
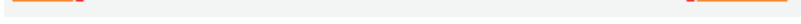
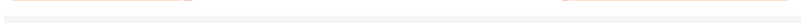
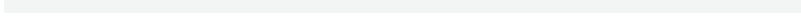
Mutante 17 PB1

Reads Start End Size

	x251	158	2043	1884
	x173	160	2045	1884
	x32	161	2046	1884
	x7	165	2004	1838
	x19	167	2100	1932
	x9	249	1956	1706
	x12	253	1960	1706
	x8	458	1805	1346
	x8	477	1734	1256

Mutante 17 PA

Reads Start End Size

	x5	126	2075	1948
	x5	128	1912	1783
	x17	132	2059	1926
	x8	134	2061	1926
	x10	144	1965	1820
	x5	204	1957	1752
	x5	205	1943	1737
	x14	518	1584	1065
	x5	520	1586	1065

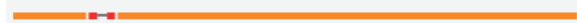
Mutante 17 HA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante 17 NP

Reads Start End Size

	x5	233	261	27
---	----	-----	-----	----

Mutante 17 NA

Reads Start End Size

No Encontrado

Mutante 17 M

Reads Start End Size



No Encontrado

Mutante 17 NS






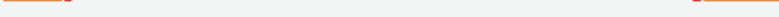

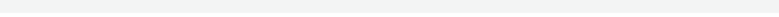
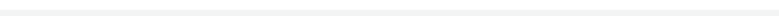
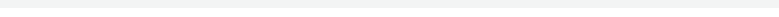
Reads Start End Size

No Encontrado

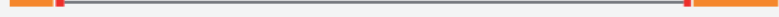

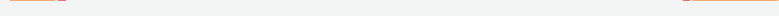

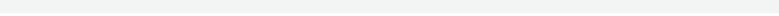
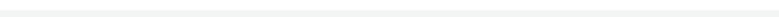
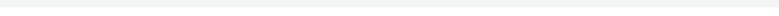
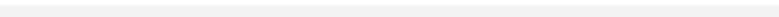

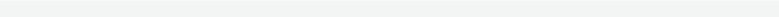

Mutante 18 PB2

	Reads	Start	End	Size
	x397	197	2068	1870
	x260	198	2069	1870
	x79	203	2074	1870
	x6	323	1989	1665

Mutante 18 PB1

	Reads	Start	End	Size
	x165	52	159	106
	x62	53	160	106
	x21	54	161	106
	x6	55	162	106
	x7	165	2101	1935
	x38	205	2078	1872
	x21	207	2080	1872
	x15	209	2082	1872
	x9	263	2027	1763
	x5	298	1897	1598

Mutante 18 PA

	Reads	Start	End	Size
	x31	158	1959	1800
	x23	159	1960	1800
	x189	163	1956	1792
	x235	165	1958	1792
	x20	177	1844	1666
	x13	178	1845	1666
	x50	236	1956	1719
	x166	238	1958	1719
	x5	243	1920	1676
	x18	303	2064	1760
	x51	305	2066	1760

Mutante 18 HA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 18 NP

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 18 NA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 18 M

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 18 NS

Reads	Start	End	Size
x7	188	691	502



Mutante 20 PB2

	Reads	Start	End	Size
	x6	126	2175	2048
	x1142	197	2068	1870
	x674	198	2069	1870
	x280	202	2073	1870
	x8	938	1021	82
	x8	2162	2193	30
	x8	2163	2194	30

Mutante 20 PB1

	Reads	Start	End	Size
	x1796	52	159	106
	x6	53	87	33
	x416	53	160	106
	x420	54	161	106
	x396	134	2072	1937
	x144	136	2074	1937
	x22	137	2075	1937
	x6	165	2204	2038
	x54	205	2078	1872
	x66	207	2080	1872
	x20	209	2082	1872
	x26	254	1921	1666
	x16	255	1922	1666
	x6	342	1947	1604
	x10	461	1882	1420

Mutante 20 PA

	Reads	Start	End	Size
	x8	128	1982	1853
	x68	142	2052	1909
	x16	143	2053	1909
	x1288	163	1956	1792
	x1790	165	1958	1792
	x44	172	1965	1792
	x72	269	1833	1563
	x10	273	1837	1563
	x6	367	1669	1301
	x16	429	1671	1241
	x32	432	1674	1241

Mutante 20 HA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 20 NP

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 20 NA

Reads	Start	End	Size
x6	100	1210	1109



Mutante 20 M

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 20 NS

Reads	Start	End	Size
x6	52	525	472
x8	54	527	472



Mutante 21 PB2

	Reads	Start	End	Size
	x298	197	2068	1870
	x242	198	2069	1870
	x92	203	2074	1870
	x17	548	1723	1174
	x9	552	1727	1174

Mutante 21 PB1

	Reads	Start	End	Size
	x5	138	2090	1951
	x284	158	2043	1884
	x159	159	2044	1884
	x19	161	2046	1884
	x5	186	2031	1844
	x8	254	275	20
	x6	283	1994	1710
	x9	384	1786	1401
	x5	384	1878	1493
	x29	385	1787	1401
	x5	386	1880	1493
	x7	491	1724	1232

Mutante 21 PA

	Reads	Start	End	Size
	x6	126	2071	1944
	x6	134	1986	1851
	x10	136	1890	1753
	x7	137	1891	1753
	x5	138	317	178
	x442	163	1956	1792
	x563	165	1958	1792
	x5	172	1965	1792
	x6	249	1828	1578
	x6	258	1865	1606
	x15	294	2060	1765
	x10	411	1958	1546

Mutante 21 HA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 21 NP

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 21 NA

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 21 M

Reads	Start	End	Size
-------	-------	-----	------

No Encontrado

Mutante 21 NS

	Reads	Start	End	Size
	x5	51	524	472

Anexo 3

Publicaciones

The Splicing Factor Proline-Glutamine Rich (SFPQ/PSF) Is Involved in Influenza Virus Transcription

Sara Landeras-Bueno^{1,2}, Núria Jorba^{1,2*}, Maite Pérez-Cidoncha^{1,2}, Juan Ortín^{1,2*}

¹ Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain, ² CIBER de Enfermedades Respiratorias, ISCIII, Bunyola, Mallorca, Spain

Abstract

The influenza A virus RNA polymerase is a heterotrimeric complex responsible for viral genome transcription and replication in the nucleus of infected cells. We recently carried out a proteomic analysis of purified polymerase expressed in human cells and identified a number of polymerase-associated cellular proteins. Here we characterise the role of one such host factors, SFPQ/PSF, during virus infection. Down-regulation of SFPQ/PSF by silencing with two independent siRNAs reduced the virus yield by 2–5 log in low-multiplicity infections, while the replication of unrelated viruses as VSV or Adenovirus was almost unaffected. As the SFPQ/PSF protein is frequently associated to NonO/p54, we tested the potential implication of the latter in influenza virus replication. However, down-regulation of NonO/p54 by silencing with two independent siRNAs did not affect virus yields. Down-regulation of SFPQ/PSF by siRNA silencing led to a reduction and delay of influenza virus gene expression. Immunofluorescence analyses showed a good correlation between SFPQ/PSF and NP levels in infected cells. Analysis of virus RNA accumulation in silenced cells showed that production of mRNA, cRNA and vRNA is reduced by more than 5-fold but splicing is not affected. Likewise, the accumulation of viral mRNA in cycloheximide-treated cells was reduced by 3-fold. In contrast, down-regulation of SFPQ/PSF in a recombinant virus replicon system indicated that, while the accumulation of viral mRNA is reduced by 5-fold, vRNA levels are slightly increased. *In vitro* transcription of recombinant RNPs generated in SFPQ/PSF-silenced cells indicated a 4–5-fold reduction in polyadenylation but no alteration in cap snatching. These results indicate that SFPQ/PSF is a host factor essential for influenza virus transcription that increases the efficiency of viral mRNA polyadenylation and open the possibility to develop new antivirals targeting the accumulation of primary transcripts, a very early step during infection.

Citation: Landeras-Bueno S, Jorba N, Pérez-Cidoncha M, Ortín J (2011) The Splicing Factor Proline-Glutamine Rich (SFPQ/PSF) Is Involved in Influenza Virus Transcription. PLoS Pathog 7(11): e1002397. doi:10.1371/journal.ppat.1002397

Editor: Andrew Pekosz, Johns Hopkins University - Bloomberg School of Public Health, United States of America

Received: January 26, 2011; **Accepted:** October 10, 2011; **Published:** November 17, 2011

Copyright: © 2011 Landeras-Bueno et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants BFU2007-60046 and BFU2010-17540 (MICINN), CIBER de Enfermedades Respiratorias (Instituto de Salud Carlos III), VIRHOST Program (S-SAL-0815-2006) (Comunidad de Madrid), FLUPOL (SP5B-CT-2007-044263) and FLUPHARM (FP7-259751) (European Union) and Fundación Marcelino Botín. S. L-B and N. J. were supported by predoctoral FPU fellowships (MICINN) and M. P-C was supported by a fellowship of the Spanish Research Council. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jortin@cnb.csic.es

‡ Current address: R&D Department, Grifols Biologicals Inc, Los Angeles, California, United States of America

Introduction

The influenza A viruses belong to the family *Orthomyxoviridae* and contain a segmented, single-stranded RNA genome of negative polarity (for a review see [1]). Each of the genomic RNA segments is encapsidated in a ribonucleoprotein particle (RNP) containing the polymerase complex and a number of nucleoprotein (NP) monomers, depending on their size [2,3]. Contrary to many other RNA viruses, the influenza virus RNPs are transcribed and replicated in the nucleus of infected cells. The enzyme responsible for these activities is the viral polymerase, a heterotrimer that comprises the PB1, PB2 and PA subunits [4–6]. The PB1 subunit acts as polymerase [7,8] while PB2 and PA are responsible for cap-binding and cap-snatching, respectively [9–12]. The heterotrimer has a compact structure [2,13–15] and is required for both transcription and replication [7,16–19]. The polymerase complex can be found associated to the RNP structure or in a soluble form [20], the latter being able to oligomerise *in vivo* [21,22]. Along the years, a number of human cell factors have been described as interactors of influenza virus polymerase and in some specific cases their role in virus replication has been studied [23–36].

In one such studies, we identified the human SFPQ/PSF factor as associated *in vivo* to influenza virus polymerase by proteomic analysis of purified complexes [34]. Human SFPQ/PSF is a nuclear multifunctional protein that has been implicated in a series of steps in the human gene expression pathway (for a review, see [37]). It was first described as associated to the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) [38] and contains regions rich in arginine/glycine and proline/glutamine close to its N-terminus as well as two RRM located more C-terminal. SFPQ/PSF can be found as a heterodimer with p54nrb/NonO, a protein that is highly homologous to the SFPQ/PSF C-terminal half. The SFPQ/PSF-p54nrb/NonO heterodimer co-purifies with DNA topoisomerase and interacts with RAD1 recombinase, leading to the stimulation of nucleic acid strand transfer and the cleavage/religation steps [39–43]. In addition, several reports have shown that SFPQ/PSF and/or p54nrb/NonO can regulate cellular transcription in a variety of genes (reviewed in [37]). In agreement with the SFPQ/PSF association with PTB, its binding has been reported to elements in the splicing machinery, like the U4/U6-U5 tri-snRNP and many other splicing factors [44–46] and the RNA pol II CTD [47], probably in a RRM-dependent manner

Authors Summary

The influenza A viruses cause annual epidemics and occasional pandemics of respiratory infections that may be life threatening. The viral genome contains 8 RNA molecules forming ribonucleoproteins that replicate and transcribe in the nucleus of infected cells. Influenza viruses are intracellular parasites that need the host cell machinery to replicate. To better understand this virus-cell interplay we purified the viral RNA polymerase expressed in human cells and identified several specifically associated cellular proteins. Here we characterise the role of one of them, the proline-glutamine rich splicing factor (SFPQ/PSF). Down-regulation of SFPQ/PSF indicated that it is essential for virus multiplication. Specifically, the accumulation of messenger and genomic virus-specific RNAs was reduced by SFPQ/PSF silencing in infected cells. Furthermore, transcription of parental ribonucleoproteins was affected by SFPQ/PSF down-regulation. The consequences of silencing SFPQ/PSF on the transcription and replication of a viral recombinant replicon indicated that it is required for virus transcription but not for virus RNA replication. *In vitro* transcription experiments indicated that SFPQ/PSF increases the efficiency of virus mRNA polyadenylation. This is the first description of a cellular factor essential for influenza virus transcription and opens the possibility to identify inhibitors that target this host-virus interaction and block virus gene expression.

[48]. Consistent with these interactions, SFPQ/PSF has been shown to stimulate the splicing of mRNAs transcribed by strong transcriptional activators and to control alternative splicing [49,50]. In spite of the above mentioned associations, most of SFPQ/PSF-p54nrb/NonO can be found in the “nuclear matrix” fraction [51], consistent with the proposed role for the heterodimer in the specific retention in the nuclear matrix of RNA which has been A>I hyperedited [37,52].

In addition to these many potential functions assigned to SFPQ/PSF or the SFPQ/PSF-p54nrb/NonO heterodimer, the former has been shown to bind specifically to a defined stem-loop in hepatitis delta RNA [53] and the 3'-end of HCV genome [54], while the latter inhibits the transport and expression of HIV mRNAs containing the instability region (INS) [55]. Here we have analysed the role of SFPQ/PSF in the influenza virus infection. Silencing the SFPQ/PSF gene, but not p54nrb/NonO, strongly reduced virus multiplication. The accumulation of viral genomic vRNA and mRNA as well as viral proteins was reduced, probably as a consequence of the inhibition of primary and secondary transcription, but normal splicing of virus mRNA was observed. *In vitro* transcription of recombinant RNPs generated in SFPQ-silenced cells resulted in reduced levels of viral poly A⁺ RNA. These results are consistent with a role for SFPQ/PSF during the polyadenylation step in the synthesis of viral mRNAs from the parental RNP templates, the earliest nuclear step in virus replication cycle, as well as during secondary transcription.

Results/Discussion

A proteomic analysis of the intracellular complexes formed by recombinant influenza virus polymerase revealed a series of human proteins that were stably associated to the viral enzyme [34]. One of such associated factors was SFPQ/PSF, a multifunctional nuclear protein involved in transcription, post-transcriptional processing of mRNAs and DNA rearrangements [37]. To study the role of SFPQ/PSF in influenza virus replication

we first analysed the expression and localisation of the protein along the infection cycle. Cultures of A549 cells were infected with VIC influenza virus at high multiplicity and total cell extracts were prepared at various times thereafter. The accumulation of SFPQ/PSF was determined by Western-blot using specific antibodies and is shown in Figure 1A. No changes in the level of expression of the

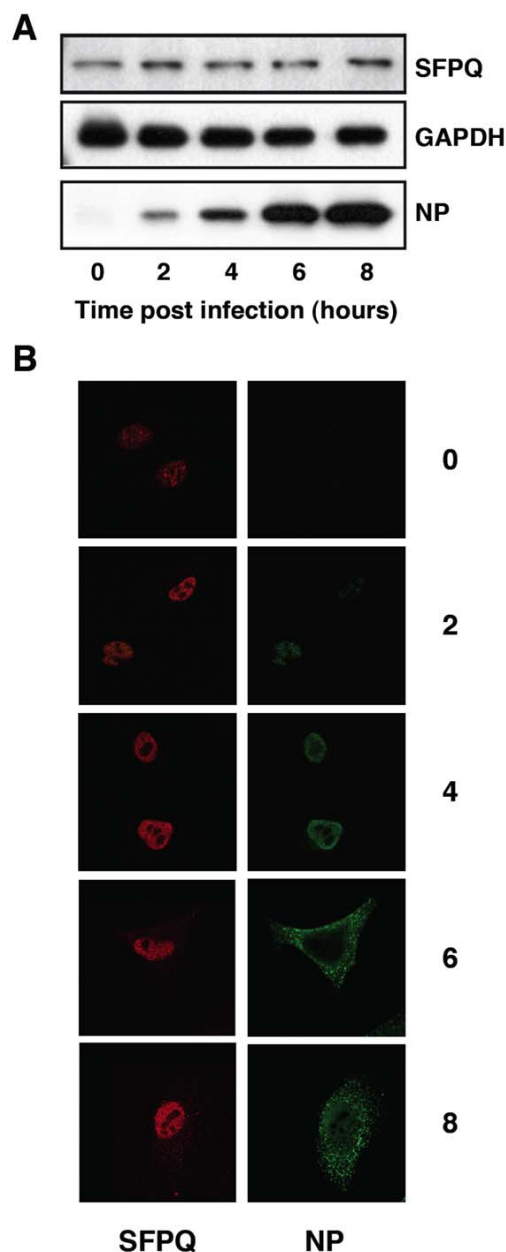


Figure 1. Accumulation and localisation of SFPQ/PSF in influenza virus infected cells. Cultures of human A549 cells were infected with the VIC strain of influenza virus at 3 pfu/cell. (A) At the times after infection indicated (hours), extracts were prepared and analysed by Western-blot with the antibodies indicated to the right. (B) At the same times, cultures were fixed and processed for immunofluorescence using antibodies specific for SFPQ/PSF and NP, as indicated. doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g001

protein were observed when compared to GAPDH as a standard, whereas the progressive accumulation of virus proteins was apparent (see NP marker in Figure 1A). Similar experiments were obtained when the WSN virus strain was used (data not shown). The localisation of SFPQ/PSF was analysed by confocal immunofluorescence and is presented in Figure 1B. The protein was found in a punctuate pattern within the nucleus, slightly more intense in the nuclear periphery and excluded from the nucleoli. No significant change could be observed in such distribution along virus infection, although a small increase in cytoplasmic staining was apparent at late times (Figure 1B). Similar results were obtained using the HeLa cell line and the WSN virus strain (data not shown).

SFPQ/PSF is specifically required for efficient influenza virus infection

In previous studies we analysed the localisation of SFPQ/PSF and NP by confocal immunofluorescence of cells infected with VIC influenza virus. A clear co-localisation was observed at 4–6 hours post-infection (hpi), particularly prominent at the periphery of the cell nucleus [34]. To further analyse this association in infected cells we carried out co-immunoprecipitation experiments. Cultures of A549 cells were infected at high moi with the VIC strain of influenza virus and at various times after infection cell extracts were prepared and used for immunoprecipitation with anti-SFPQ/PSF or control antibodies. The immunoprecipitates were analysed by Western-blotting with antibodies specific for SFPQ/PSF and NP. The results are presented in Figure 2 and a clear co-immunoprecipitation of NP was observed with the SFPQ/PSF-specific antibodies. In view of these results, the relevance of SFPQ/PSF for influenza virus multiplication was then studied by gene silencing. Cultures of A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific siRNA, or a scrambled unspecific siRNA as a control, and then infected with VIC influenza virus at low multiplicity. Samples were withdrawn from the supernatant medium at various times after infection and the virus titre was determined by plaque-assay on MDCK cells. The results of kinetics experiments run in triplicate are presented in Figure 3A. A protracted virus growth kinetics was apparent in the SFPQ/PSF-silenced cultures as compared to cultures transfected with control siRNA and the final titre was reduced by 2–3 log units in various experiments similar to that presented in Figure 3A. The level of SFPQ/PSF down-regulation was verified at various times after siRNA transfection and virus infection and is presented in Figure 3D. These results suggested that SFPQ/PSF plays an

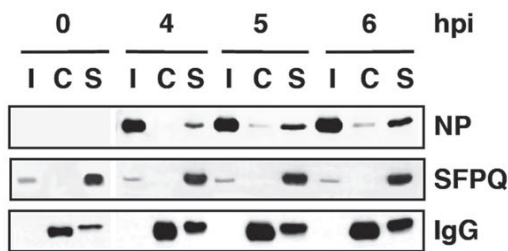


Figure 2. Association of viral ribonucleoproteins with SFPQ/PSF. Cultures of human A549 cells were infected with the VIC strain of influenza virus at 3 pfu/cell. Total cell extracts were prepared at the times after infection indicated (hpi) and immunoprecipitated with anti-SFPQ/PSF or control antibodies. The immunoprecipitates were analysed by Western-blot using antibodies specific for SFPQ/PSF or NP, as indicated. I: Input extract. C: Control antibody. S: SFPQ/PSF specific antibody.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g002

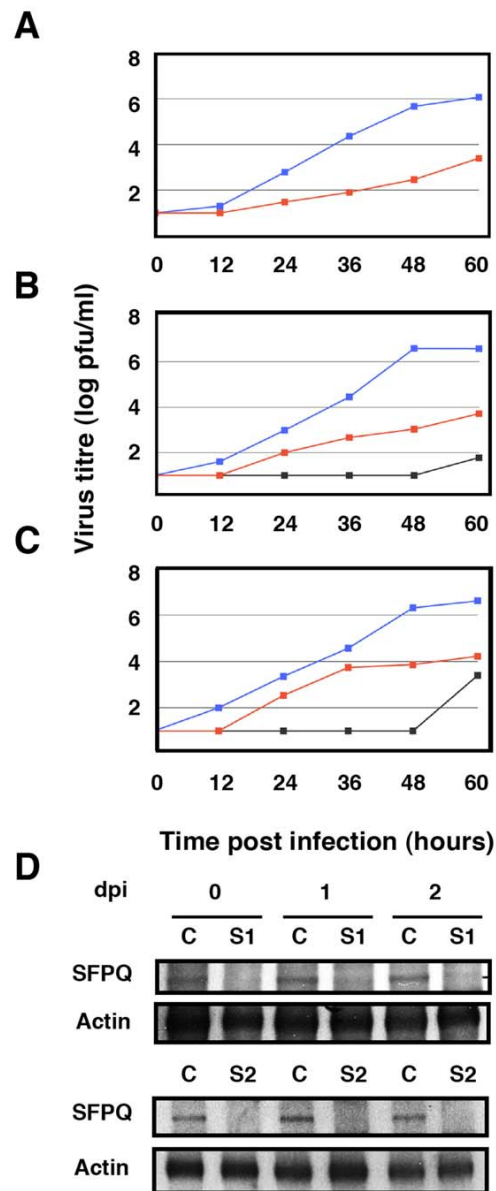


Figure 3. Kinetics of influenza virus multiplication in SFPQ/PSF-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific or control siRNAs as described under Materials and Methods and then infected with influenza virus at a moi of 0.001 pfu/cell. Aliquots of the supernatant media were withdrawn at the times indicated and used for virus titration by plaque-assay. The results presented are representative of two/three independent experiments. (A) Cultures were silenced with control siRNA (blue) or siRNA-1 (red) and infected with the VIC strain. (B) Cultures were silenced with control siRNA (blue), siRNA-1 (red) or siRNA-2 (grey) and infected with a recombinant virus containing the M, HA and NA segment of WSN in the background of VIC strain. (C) Cultures were silenced with control siRNA (blue), siRNA-1 (red) or siRNA-2 (grey) and infected with WSN strain. (D) At the times after infection indicated (days), the accumulation of SFPQ/PSF was determined in the cultures transfected with control (C) or SFPQ/PSF siRNAs (S1 or S2, as indicated) by Western-blot using anti-SFPQ/PSF antibodies.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g003

important role during influenza virus infection. To verify that the virus growth inhibition is really due to SFPQ/PSF down-regulation and not to a spurious off-target effect of the particular siRNA used, similar experiments were performed with an independent SFPQ/PSF-specific siRNA and the results are presented in Figure 3B and 3C. Furthermore, two additional virus strains were used in these experiments, WSN and a VIC/WSN recombinant virus. Again, a strong reduction in the yield of virus production was obtained, thereby confirming that SFPQ/PSF is an important human host factor for the multiplication of influenza virus.

As SFPQ/PSF is a multifunctional protein involved in many steps of cellular transcription and post-transcriptional RNA processing [37], it is conceivable that its down-regulation indirectly leads to reductions in influenza virus multiplication. For instance, it would be conceivable that SFPQ/PSF down-regulation inhibits cellular transcription and/or splicing to a level that makes influenza virus unable to replicate, as it depends on these processes for its own transcription and gene expression. Such a possibility would seem unlikely, as the general pattern of cellular protein synthesis is not altered by SFPQ/PSF silencing (see below), but we carried out controls to ascertain the specificity of SFPQ/PSF requirement for influenza virus multiplication. The multiplication of two additional viruses was studied in SFPQ/PSF-silenced cells: Vesicular stomatitis virus (VSV), as an additional example of negative-stranded RNA virus, and Adenovirus 5 (Ad5), as a nuclear virus that is strongly dependent on the cellular transcriptional and splicing machineries. Cultures of A549 cells were SFPQ/PSF- or control-silenced and infected with either VSV or Ad5 and the virus accumulated in the culture supernatant (VSV) or the infected cells (Ad5) was determined by plaque-assay on BHK21 (VSV) or HEK293T cells (Ad5). As presented in Figure 4A and 4B, the multiplication of neither virus was affected by the down-regulation of SFPQ/PSF, indicating that this human protein is a host factor specifically important for influenza virus multiplication.

Since it has been shown that SFPQ/PSF associates to p54nrb/NonO (see above), it was important to ascertain whether influenza virus requires SFPQ/PSF or the SFPQ/PSF-p54nrb/NonO heterodimer for proper multiplication. Hence, we analysed the multiplication of influenza virus in A549 cells after silencing p54nrb/NonO by transfection of a p54nrb/NonO-specific siRNA. Importantly, silencing of p54nrb/NonO did not alter the accumulation of SFPQ/PSF or vice versa (data not shown). As indicated in Figure 5, no reduction in virus yield was observed when using the VIC virus strain (Figure 5A) and a small reduction in WSN virus amplification was observed by down-regulation of p54nrb/NonO, much more limited than that observed when silencing SFPQ/PSF (Figure 5B), in spite of an almost complete block of p54nrb/NonO expression (Figure 5C). Therefore, we conclude that it is SFPQ/PSF by itself what influenza virus requires carrying out a normal infection cycle.

Down-regulation of SFPQ/PSF reduces virus RNA replication and gene expression

Once the relevance of SFPQ/PSF for influenza virus infection was verified, we analysed the role of this host factor in the virus cycle. First, the synthesis of viral proteins was studied in SFPQ/PSF- and control-silenced A549 cells. Cultures of SFPQ/PSF- or control-silenced A549 cells were infected at high multiplicity and pulse-labelled with ³⁵S-met-cys at various times after infection. The labelled proteins were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography and the results are presented in Figure 6. The synthesis of the major virus proteins was reduced and delayed in SFPQ/PSF-silenced cells, indicating that SFPQ/PSF down-regulation leads to a general reduction and delay in

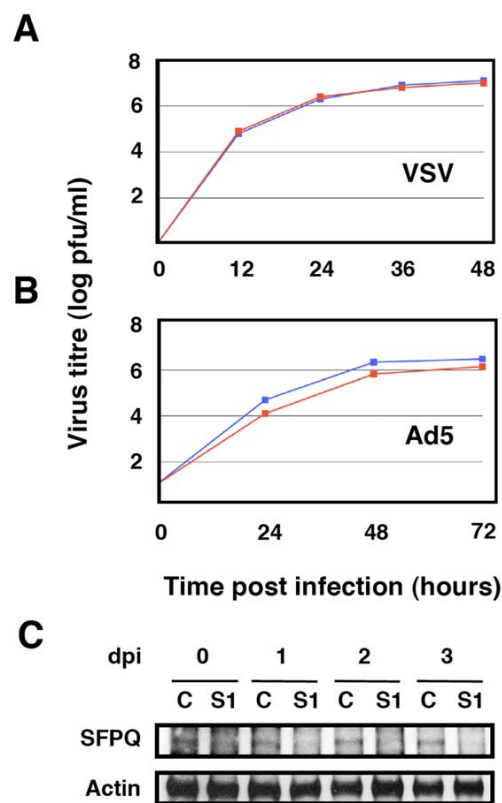


Figure 4. Kinetics of VSV and Ad5 multiplication in SFPQ/PSF-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific siRNA-1 (S1) or control (C) siRNAs, infected with VSV or Ad5 as described under Materials and Methods and virus titration was performed with samples obtained at the times indicated. The results presented are representative of two/three independent experiments. (A) Cultures were silenced with control siRNA (blue) or siRNA-1 (red) and infected with VSV at a moi of 0.001 pfu/cell. (B) Cultures were silenced with control siRNA (blue) or siRNA-1 (red) and infected with Ad5 at a moi of 2 pfu/cell. (C) At the times after infection indicated (days), the accumulation of SFPQ/PSF was determined in the cultures transfected with control (C) or SFPQ/PSF siRNAs (S1) by Western-blot using anti SFPQ/PSF antibodies. doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g004

virus gene expression. However, it is worth mentioning that only a slight change was observed in the level and pattern of cellular protein synthesis upon SFPQ/PSF silencing (compare lanes 0 in siCTRL and S1 panels in Figure 6). Similar results were obtained when the accumulation of viral proteins was determined by Western-blot (Figure S1).

To analyse further the phenotype of the infection cycle in SFPQ/PSF-silenced cells, the localisation of progeny RNPs was studied by confocal immunofluorescence with anti-NP antibodies. The results are presented in Figure 7. As expected, the level of SFPQ/PSF was decreased in SFPQ/PSF-silenced cells and a general reduction in NP signal was observed, as compared with infected, control-silenced cells (Figure 7A). Only cells with a level of SFPQ/PSF similar to that of control-silenced cells showed an accumulation of NP comparable to control infected cells, although the localisation was not normal (Figure 7A; arrow). Significantly, a linear correlation was observed between the immunofluorescence signals of SFPQ/PSF and NP in random fields of control- or SFPQ/PSF-silenced cells (Figure 7B). Thus, the low levels of virus protein synthesis (Figure 6) and the

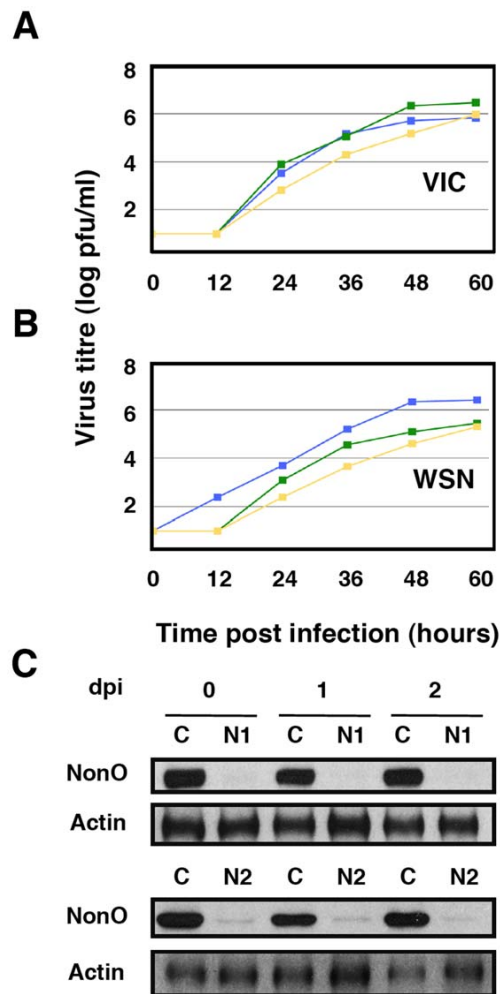


Figure 5. Kinetics of influenza virus multiplication in NonO-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with NonO-specific (N1 or N2, as indicated) or control (C) siRNAs as described under Materials and Methods and then infected with influenza virus at a moi of 0.001 pfu/cell. Aliquots of the supernatant media were withdrawn at the times indicated and used for virus titration by plaque-assay. The results presented are representative of two/three independent experiments. (A) Cultures were silenced with control siRNA (blue), siRNA N1 (green) or siRNA N2 (yellow) and infected with the VIC strain. (B) Cultures were silenced as above and infected with WSN virus. (C) At the times after infection indicated (days), the accumulation of NonO/p54 was determined in the cultures transfected with control (C) or SFPQ/PSF siRNAs (N1 or N2, as indicated) by Western-blot using anti NonO/p54 antibodies.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g005

small virus production (Figure 3) observed in SFPQ/PSF-silenced cultures could be simply the consequence of the infection of a small number of cells not completely silenced upon transfection of SFPQ/PSF-specific siRNA.

Viral transcription, but not splicing, is affected in SFPQ/PSF silenced cells

The reduction of virus protein synthesis under conditions of SFPQ/PSF down-regulation might be due to defects in genome amplification, virus transcription, splicing or translation of viral

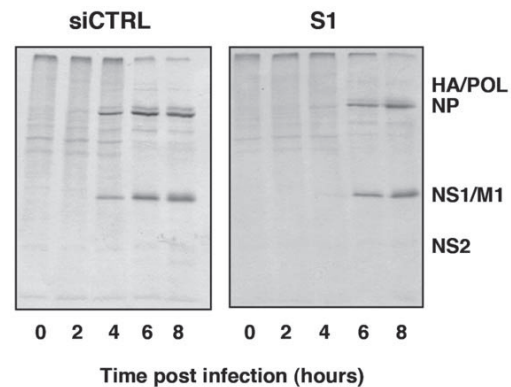


Figure 6. Kinetics of influenza virus protein synthesis in SFPQ/PSF-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific siRNA-1 (S1) or control siRNA (siCTRL) as described under Materials and Methods and then infected with VIC virus at a moi of 3 pfu/cell. At the times in hours indicated the cultures were pulse-labelled with 35 S-met-cys and total protein extracts were prepared. The samples were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. The mobility of some of the virus-specific proteins is indicated to the right.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g006

mRNA. As SFPQ/PSF has been described as a splicing factor, we first analysed whether its down-regulation would alter the splicing of virus mRNAs. The amounts of NS1 and NS2 mRNAs were determined in control and SFPQ/PSF silenced infected cells by a RT-qPCR procedure using TaqMan probes (Table S1). The proportion of NS1 versus total NS mRNA was indistinguishable in both experimental conditions (ratio control/silenced cells 1.016 ± 0.035 ; $n = 7$ experiments). Next, the levels of accumulation of vRNA, cRNA and mRNA were determined in SFPQ/PSF-silenced and control-silenced cells. Total cell RNA was isolated at various times after high-multiplicity infections and the amounts of virus-specific RNAs corresponding to the NP, NS and M virus segments were determined by hybridisation with specific probes. The results of a representative experiment are presented in Figure 8. In control-silenced cells, the kinetics of accumulation of virus RNAs showed a pattern analogous to that previously described [56,57], while in SFPQ/PSF-silenced cells a protracted kinetics was observed and 4–5 fold reductions in maximal accumulations of vRNA, cRNA and mRNA were determined. These results indicated that SFPQ/PSF is required for virus RNA replication but could not tell whether this was a direct effect and whether SFPQ/PSF also played a role in virus transcription. To clarify these questions, the accumulations of primary virus transcripts were determined after infection of SFPQ/PSF-silenced and control-silenced cells. The cells were infected at high multiplicity in the presence of cycloheximide to avoid the synthesis of viral proteins and hence the replication of viral RNA [58]. The accumulation of total NS transcripts was determined by RT-qPCR and demonstrated that silencing SFPQ/PSF leads to a 3-fold reduction in primary transcription (Figure 9A). To verify the inhibition of virus multiplication, virus mRNA was determined in infected cells treated or not with cycloheximide. The results are presented in Figure 9B and document around 50-fold reduction upon treatment with the drug.

These results suggest that SFPQ/PSF might simply be required for virus primary transcription and the observed reduction in vRNA accumulation would be an indirect consequence, since viral protein expression is essential for viral RNA replication [58]. To

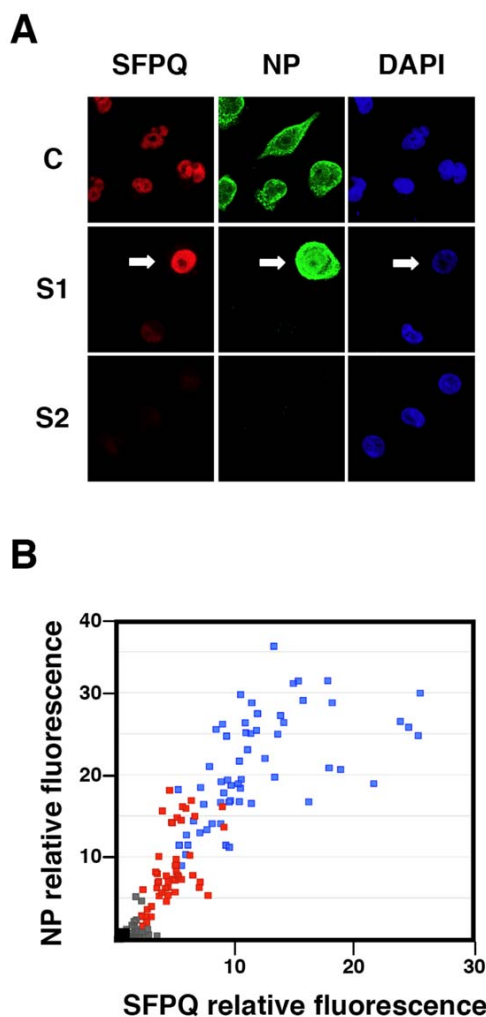


Figure 7. Cytological analysis of influenza virus infection of SFPQ/PSF-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with control siRNA (C) or SFPQ/PSF-specific siRNAs (S1 or S2 as indicated), as described under Materials and Methods, and then infected with VIC virus at a moi of 3 pfu/cell. The cultures were fixed at 6 hpi and processed for immunofluorescence using antibodies specific for SFPQ/PSF and NP. (A) The images presented are representative confocal sections showing the presence of nuclei (DAPI –blue–), SFPQ/PSF (red) and NP (green). (B) Graphical representation of the NP (vertical axis) and SFPQ/PSF (horizontal axis) signals obtained for random 1024x1024 images of each sample. Blue: Control-silenced cultures. Red: SFPQ/PSF-silenced cultures (S1). Grey: SFPQ/PSF-silenced cultures (S2). The black dot indicates the background signals obtained for cultures stained with the secondary antibodies only.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g007

test whether virus RNA replication is directly inhibited by SFPQ/PSF down-regulation, in addition to the observed inhibition of primary transcription, we made use of a recombinant replicon system to analyse RNA replication and secondary transcription. In this system, no primary transcription is required for RNA replication to take place, as the virus proteins are provided by plasmid expression in *trans*. Human HEK293T cells were transfected with SFPQ-specific or control siRNAs and later transfected with plasmids encoding the virus polymerase subunits,

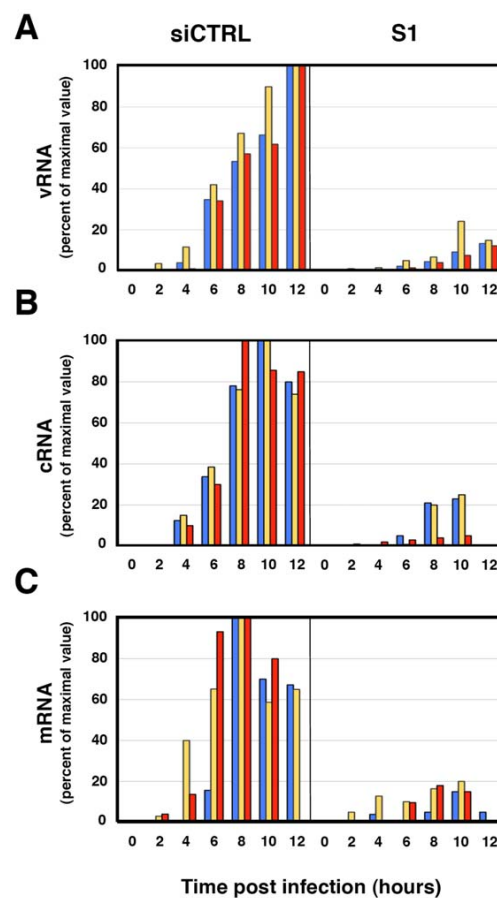


Figure 8. Accumulation of positive- and negative-polarity RNAs during the influenza virus infection of SFPQ/PSF-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific (S1) or control siRNAs (siCTRL) as described under Materials and Methods and then infected with influenza virus at a moi of 3 pfu/cell. Total cell RNA was isolated at the times indicated and used for determination of vRNA (A) cRNA (B) or mRNA (C) by hybridisation with probes specific for NP (blue), NS (yellow) and M (red). The data is presented as percent of maximal values and is representative of three independent kinetics experiments.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g008

NP and a virus genomic plasmid encoding the *cat* gene in negative polarity. The down-regulation of SFPQ/PSF was ascertained by Western-blot (Figure 10D) and the CAT protein accumulation was determined as a reporter of total replicon activity. The results indicated that silencing SFPQ/PSF lead to a 5-fold reduction in CAT expression (Figure 10A). To determine whether this reduction was due to alterations in viral RNA replication, transcription or both, total cell RNA was isolated and used to determine negative-polarity and positive-polarity RNA accumulations by hybridisation with specific probes. As shown in Figure 10B, a 5-fold reduction in viral transcription was apparent, whereas a two-fold increase was observed between the accumulations of vRNA in control or SFPQ/PSF-silenced cells (Figure 10C). These results indicated that SFPQ/PSF is required for viral transcription, but not for virus RNA replication and suggest that, in the absence of SFPQ/PSF, the viral RNPs are preferentially devoted to RNA replication instead of transcribing their template.

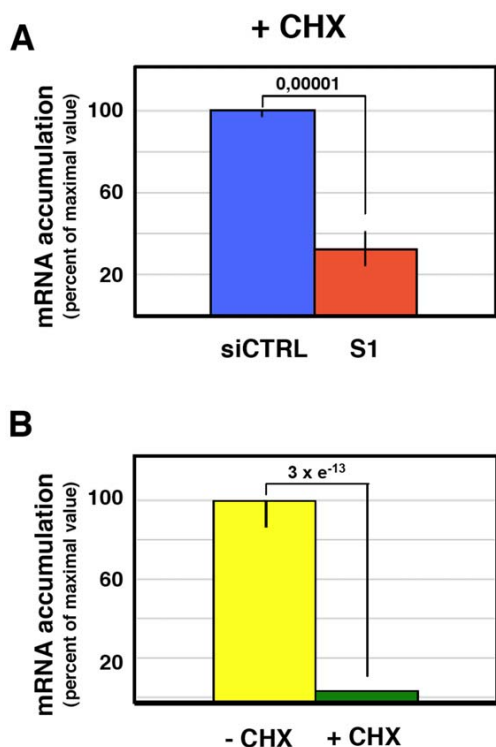


Figure 9. Accumulation of mRNA during the influenza virus infection of SFPQ/PSF-silenced cells treated with cycloheximide. Cultures of human A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific (S1) or control siRNAs (siCTRL) as described under Materials and Methods and then infected with influenza virus at a moi of 3 pfu/cell for 6 hours in the presence or absence of cycloheximide (100 μ g/ml). The accumulation of viral RNA was determined by RT-qPCR using probes specific for the NS segment. Significance was determined by the Student's *t* test. (A) The accumulation of viral RNA in control and SFPQ/PSF-silenced cells treated with cycloheximide is presented as average and standard deviation of 6 determinations. (B) The accumulation of mRNA in infected cells treated or not with cycloheximide is presented as average and standard deviation of 6 determinations. doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g009

Depletion of SFPQ/PSF leads to diminished production of viral polyadenylated RNA *in vitro*

One possible mechanism to explain the effects of SFPQ/PSF down-regulation on influenza virus transcription would imply that the interaction of SFPQ/PSF with the viral polymerase present in the RNP increases the affinity of the enzyme for the cap structure. The apparent *K_d* for the interaction of the isolated PB2 cap-binding domain with 7mGTP is around 170 μ M [10], in good agreement with the inhibition data reported for cap-RNA crosslinking to influenza virus RNPs [59], whereas the affinity of binding of eIF4E or CBC to cap-analogues is much higher [60,61]. This is in contradistinction to the elution profiles of eIF4F and influenza polymerase-template complexes on a 7mGTP-Sepharose resin [14] which show a stronger binding of the latter. Hence, it is conceivable that some cellular factor(s), for instance SFPQ/PSF, interact with viral polymerase and enhances its affinity for binding to cap. To test such possibility we generated recombinant RNPs by transfection of HEK293T cells, which had previously been either control- or SFPQ/PSF-silenced. Total cell extracts of these cells were used for *in vitro* transcription using β -globin mRNA as cap-donor. A wide concentration range of cap-

donor was employed to test for a potential difference in cap-donor dose response when the reaction was performed in the presence or absence of SFPQ/PSF protein. The results are presented in Figure 11 and no change in the profile of virus RNA synthesis was apparent when SFPQ/PSF was silenced (Figure 11B). However, a clear change in the size distribution of RNA products was observed depending on the downregulation of SFPQ/PSF and irrespective of the cap-donor concentration (Figure 11A). In the presence of SFPQ/PSF the RNA profile was reminiscent of a polyadenylated virus mRNA, as the transcript size was slightly larger than the template (used in the gel as a marker) while downregulation of SFPQ/PSF led to a variety of RNA sizes, always smaller than the template. To further characterise the transcripts generated with SFPQ/PSF-silenced samples they were separated into poly A⁺ and poly A⁻ fractions and analysed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The results are presented in Figure 12. A consistent reduction in the amount of polyadenylated RNA was observed when SFPQ/PSF was downregulated, with a corresponding increased in the poly A⁻ fraction (Figure 12A). Quantification of 5 experiments indicated that the total amount of transcript was not affected by SFPQ/PSF downregulation but the fraction of poly A⁺ viral mRNA was reduced about 4–5 fold (Figure 12 B). Similar results were obtained when other SFPQ/PSF-specific siRNA was used (see Figure S2). A considerable fraction of the viral poly A⁻ transcripts showed sizes smaller than the template, consistent with RNA degradation or premature termination but, interestingly, the profile of these poly A⁻ transcripts was identical for control- or SFPQ/PSF-silenced samples, suggesting that the reduction in poly A⁺ transcripts is not due to a defect in transcript elongation but most probably to a deficiency in the polyadenylation step.

Concluding remarks

The results presented here show that SFPQ/PSF is specifically required for influenza virus multiplication and indicate that this cellular factor is essential for the transcription of viral RNPs during both primary and secondary mRNA synthesis. Furthermore, the results shown suggest that SFPQ/PSF plays a role during the polyadenylation step in virus transcription. With the evidence presented, the following picture could be envisaged upon SFPQ down-regulation in infected cells: The primary viral mRNAs lacking poly A would be unstable and hence their accumulation diminished as compared to infections performed in normal cells. In addition, normal recycling of the transcribing polymerase could be affected. As a consequence of these effects, viral RNA replication would be indirectly inhibited, since little polymerase and NP would be synthesised. Moreover, a similar inhibition could be predicted for secondary transcription of the small amount of viral progeny RNA, with the final result of very low viral gene expression and virus production.

At present it is not clear how SFPQ/PSF participates in the polyadenylation step of viral transcription. The available evidence indicates that polyadenylation of viral mRNAs is carried out by the polymerase by reiterative copy of the oligo U signal located close to the 5'-terminus of the vRNA template [62–65] and is mechanistically distinct from the cellular cleavage and polyadenylation process. The SFPQ/PSF protein is an RNA-binding protein that has been described as essential for the formation of the spliceosome and can be cross-linked to the pre-mRNA in the spliceosome [46]. Furthermore, purified SFPQ/PSF can be specifically cross-linked to poly U, but not to poly C, A or G, showing the same sequence specificity than PTB [38]. Therefore, it is tempting to speculate that SFPQ/PSF could interact both with the viral polymerase [34] and with the viral polyadenylation signal

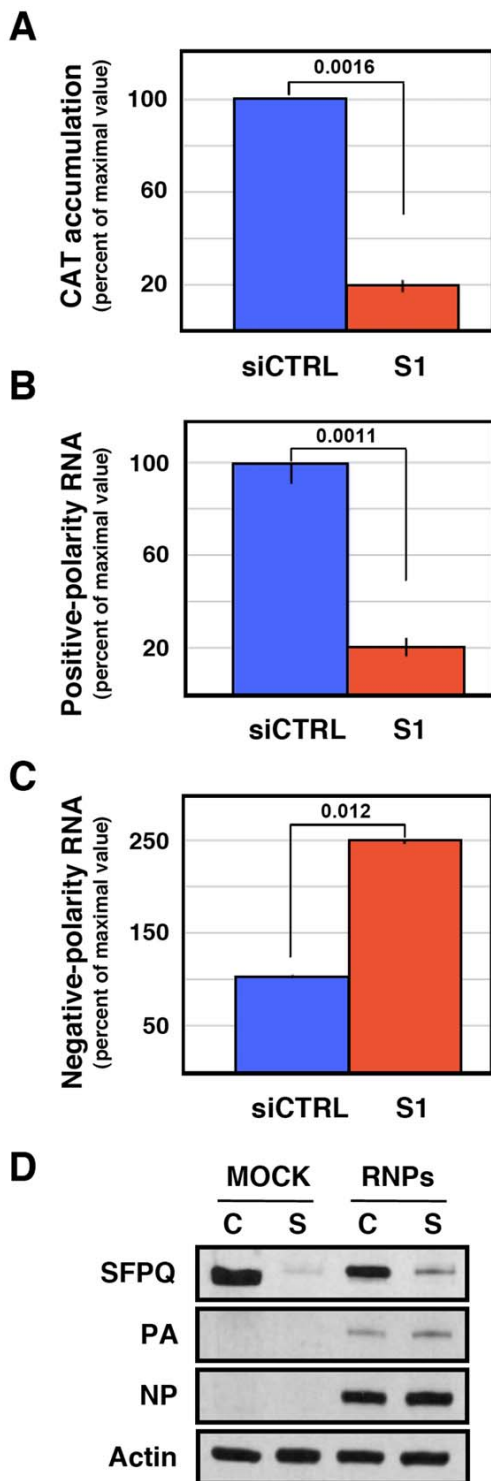


Figure 10. Accumulation of positive- and negative-polarity RNA in a recombinant replicon system. Cultures of HEK293T cells were transfected with SFPQ/PSF-specific (S1) or control siRNAs (siCTRL) as described under Materials and Methods. When the expression of SFPQ/PSF was known to be down-regulated, the cultures were further transfected with plasmids expressing the polymerase subunits and the

NP, as well as with a genomic plasmid expressing a pseudoviral gene containing the *cat* gene in negative polarity. As control, the cultures were transfected with empty plasmids. At 24 hours post plasmid transfection total cell extracts were prepared and total cell RNA was isolated. Significance was determined by the Student's *t* test. (A) The accumulation of CAT protein is indicated as percent of maximal values. (B) The accumulation of positive-polarity RNA was determined by hybridisation with CAT-specific probes and is presented as percent of maximal values. (C) The accumulation of negative-polarity RNA was determined by hybridisation with CAT-specific probes and is presented as percent of maximal values. The values presented represent the average and standard deviation of 3 independent transfection experiments. (D) The silencing of SFPQ was controlled by Western-blot, using actin as loading control. The level of expression of PA and NP was ascertained by Western-blot.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g010

within the RNP to promote polymerase stuttering at the site. Further experiments will be required to test this and other possible alternatives.

Down-regulation of SFPQ/PSF leads to a dramatic decrease in the yield of virus infection and hence it could be considered as a new target for antiviral design, a particularly interesting one as it is involved in a very early stage of the infection. Silencing of mouse SFPQ/PSF leads to chromosome instability [66] and we have verified that down-regulation of SFPQ/PSF in some human cells strongly reduces their growth kinetics (unpublished results). Therefore, one should aim at blocking the association of SFPQ/PSF with virus polymerase/RNP for the design of potential new antivirals.

Materials and Methods

Biological materials

The HEK 293T cell line [67] was obtained from J.C. de la Torre and the A549 human cell line [68] was obtained from J.A. Melero. The MDCK and BHK21 cell lines were purchased from ATCC. Cell culture was carried out as described [69]. The influenza virus strains A/Victoria/3/75 (H3N2) (VIC), WSN (H1N1) and a recombinant of both strains (VIC/WSN) was used in these experiments. Titrations were done in MDCK cells as described [70]. Vesicular stomatitis virus (VSV) was provided by R. Alfonso and titrated in BHK21 cells. Adenovirus 5 was provided by P. Fortes. Virus stocks were prepared and titrated in HEK 293T cells as described [71].

Plasmids pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPA and pCMVNP, expressing the influenza virus polymerase subunits and the NP have been described [57]. Plasmid pHHCAT, that transcribes a virus-like *cat* gene in negative polarity, was provided by A. Rodríguez. The monoclonal antibodies specific for PA have been described [72,73]. A monoclonal antibody specific for the N-terminal region of M1 and M2 proteins [74] was provided by A. García-Sastre. Antisera specific for PB1 and NP were generated by immunisation of rabbits with recombinant proteins [2,14,31]. A monoclonal antibody specific for SFPQ/PSF (ab11825) and polyclonal sera specific for GAPDH (ab9485) and actin (ab8226) were purchased to Abcam. The secondary antibodies used for Western-blot and immunofluorescence was purchased to Sigma and Invitrogen, respectively. Total mouse IgG, with no known specificity, was used as immunoprecipitation control.

Protein analyses

Protein samples were separated by polyacrylamide-SDS gel electrophoresis and transferred to Immobilon filters. Western-blotting was carried out essentially as described [75]: The membranes were saturated with 3% BSA for 1 h and then

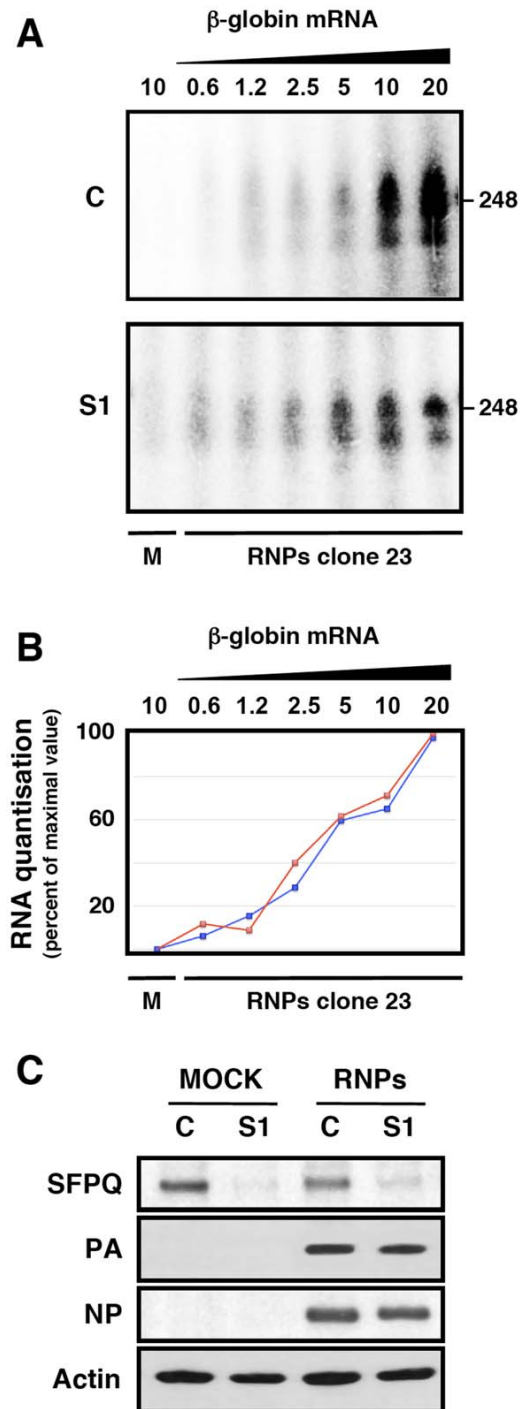


Figure 11. Cap-donor dose-response for *in vitro* transcription of recombinant RNPs. Cultures of HEK293T cells were transfected with SFPQ/PSF-specific (S1) or control siRNAs (siCTRL) as described under Materials and Methods. When the expression of SFPQ/PSF was known to be down-regulated, the cultures were further transfected with plasmids expressing the polymerase subunits and the NP, as well as with a genomic plasmid expressing a deleted NS RNA segment (clone 23) [2] in negative polarity. Extracts of these cultures were used for *in vitro* transcription using increasing amounts of β -globin mRNA as a cap donor and the transcripts were analysed by denaturing polyacrylamide

gel electrophoresis. (A) Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of *in vitro* transcripts. M denotes a mock-reconstitution of recombinant RNPs in which pcDNA3 plasmid was transfected. The concentrations (μ g/ml) of β -globin mRNA used as cap-donor are indicated to the top. The mobility of a genome-size marker of 248 nt is indicated to the right. (B) The quantisation of the results presented in A is presented as percent of maximal value in each series. Blue line: Control-silenced extract. Red line: SFPQ/PSF-silenced extract. (C) The down-regulation of SFPQ/PSF by silencing was verified by Western-blot with specific antibodies. The level of expression of PA and NP was ascertained by Western-blot.
doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g011

incubated with the primary antibodies for 1 h at room temperature. The filters were washed with PBS containing 0.25% Tween 20 and incubated with the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. After further washing as above the filters were developed by enhanced chemiluminescence. For immunoprecipitations, extracts from mock-infected or infected cells were incubated with goat-antimouse-agarose beads (A6531, Sigma) loaded with a monoclonal antibody specific for SFPQ/PSF or an equal amount of total mouse IgG as negative control. After extensive washing with a buffer containing 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 μ l HPRI and protease inhibitors containing EDTA, the beads were extracted by boiling with Laemmli loading buffer and the samples were analysed by Western-blot with antibodies specific for SFPQ/PSF and NP. For immunofluorescence, cells were fixed with 3% paraformaldehyde. The cultures were permeabilised with 0.5% Triton X100 and processed for indirect immunofluorescence as described before [31]. Images were collected on a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) and processed with the LAS AF Software (Leica Microsystems). For quantisation of cellular staining with anti-SFPQ/PSF and NP antibodies, the average intensities of 50 random images (1024 \times 1024 pixels) of each preparation were determined using the LAS AF Software. The procedures for protein labelling *in vivo* have been described [76]. Cultures were washed, incubated for 1 h in a DMEM medium lacking met-cys and labelled with ³⁵S-met-cys to a final concentration of 200 μ Ci/ml. After incubation for 1 h, total extracts were prepared in Laemmli sample buffer and processed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. Quantisation of CAT protein in total cell extracts was done by ELISA (GE Healthcare).

RNA analyses

The amplification *in vivo* of recombinant RNPs was performed essentially as described [77]. In brief, cultures of HEK293T cells (2.5×10^6 cells) were transfected with a mixture of plasmids expressing the polymerase subunits (pCMVPB1, 12.5 ng; pCMVPB2, 12.5 ng; pCMVPA, 2.5 ng), NP (pCMVNP, 500 ng) and a genomic plasmid expressing a vRNA-like *cat* gene (pHHCAT, 500 ng), using the calcium phosphate technique [78]. At 24 hours post-transfection, total cell extracts were prepared for CAT determination or total cell RNA was extracted. For RNA extraction cell pellets were resuspended in 1 ml of TRIzol reagent (Invitrogen) and the RNA was purified as recommended by the manufacturer. The RNA was digested with RNase-free DNase (1 μ g) for 1 h at 37°C, extracted with phenol-chloroform-isoamylalcohol and precipitated with ethanol. For alternative splicing studies, poly A⁺ RNA was isolated by two rounds of chromatography on oligo-dT-cellulose as described previously [79]. The purified RNA was resuspended in nuclease-free water and the absorbance was measured at 260 nm (NanoDrop ND-1000).

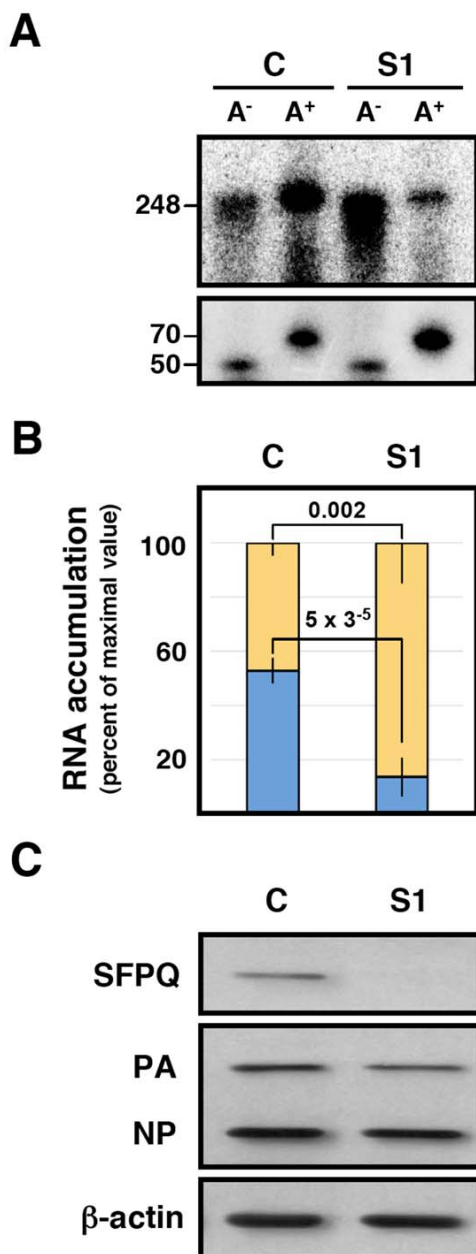


Figure 12. Dependence of SFPQ/PSF for the *in vitro* polyadenylation of transcripts. Recombinant RNPs were generated in control-silenced (C) or SFPQ/PSF-silenced (S1) HEK293T cells and *in vitro* transcription was performed as indicated in the legend to Figure 11. The transcripts were separated into poly A⁺ and poly A⁻ fractions, using a non-polyadenylated oligonucleotide (50 nt) and a polyadenylated oligonucleotide (70 nt) as recovery probes, and the fractionated transcripts were analysed by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gels. (A) Representative results of five independent experiments. The positions of a 248 nt marker identical to the clone 23 genome, as well as the recovery probes are indicated to the left. (B) Quantification of the proportion of the poly A⁺ (blue) and poly A⁻ (yellow) transcripts after normalisation for recovery. The data represent averages and standard deviations of five experiments. Significance was determined by the Student's *t* test. (C) The silencing of SFPQ was controlled by Western-blot, using actin as loading control. The level of expression of PA and NP was ascertained by Western-blot. doi:10.1371/journal.ppat.1002397.g012

For dot-blot hybridisation, aliquots of purified RNAs were denatured for 15 min at 55°C in 10SSC, 7.5% formaldehyde and fixed on nylon filters by UV cross-linking. As controls, total yeast RNA or various amounts of plasmids containing cDNAs of the full-length virus genomic segments or the corresponding viral mRNAs, were fixed on the hybridisation filters. Hybridisation was carried out overnight at 40°C in 6xSSC, 0.5% SDS, 5× Denhardt's mixture 26–47% formamide, depending on the probe, and 100 µg/ml single-stranded DNA. After washing with 0.5xSSC-0.5% SDS at 40°C, the filters were quantified in a phosphorimager. As probes, synthetic oligonucleotides specific to detect the various RNA species of each RNA segment analysed were used (Table S1). They were labelled with gamma-³²P-ATP and polynucleotide kinase. Additionally, specific riboprobes were used to specifically detect cRNAs. They were transcribed by T3 RNA polymerase using as templates synthetic DNAs containing T3 promoters fused to the viral sequences (Table S1).

For siRNA transfection, cultured A549 cells were incubated independently with 5 nM of siSFPQ 1 (107613), siSFPQ 2 (15923), specific for SFPQ, or siNonO 1 (s9614), siNonO 2 (s9612), specific for NonO, or an irrelevant siRNA (AM4611) from Ambion, using Lipofectamine (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Transfection was carried out twice on consecutive days to increase the silencing efficiency before infection.

Quantification of virus-specific RNAs for splicing and primary transcription analyses was carried out by RT-qPCR as follows: The RT reaction was performed by addition of 100 ng of RNA resuspended in 10 µl of nuclease-free water and 10 µl of Reaction Mix 2x (Applied Biosystems) as recommended by the manufacturer. From each 20-µl reaction, 2 µl of cDNA was transferred directly to 96-well PCR plates and 12.5 µl of TaqMan universal master mixture (Applied Biosystems) and 1.25 µl of Custom TaqMan assay (designed by Applied Biosystems) were added. PCR was carried out in a PRISM 7000 Sequence detection system (Applied Biosystems), with 1 cycle of 50°C for 2 min followed by 1 cycle of 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The cycle threshold (Ct) was determined with analytical software (SDS; Applied Biosystems). Serial dilutions of cDNA were used to ensure amplification in the lineal range. To construct calibration curves for quantification, we generated PCR products whose sequences were identical to the spliced or unspliced mRNAs of NS segment. The sequences of TaqMan probes and primers are presented in Table S1. For *in vitro* transcription, extracts from control- or SFPQ/PSF-silenced HEK293T cells in which a mini-RNP was reconstituted [2] were incubated for 60 min at 30°C in 20 µl reactions containing 50 mM Tris.HCl, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM each of ATP, CTP and UTP, 1 µM alpha-³²P-GTP (0.5 mCi/µmol), 10 µg/ml actinomycin D, 1 u/µl HPRI, pH 8.0 and µg/ml (or various amounts, depending on the experiment) β-globin mRNA. The reaction products were phenol-extracted, ethanol-precipitated and analysed by electrophoresis on 6% polyacrylamide-7 M urea gels. The purified *in vitro* transcripts were separated into poly A⁺ and poly A⁻ fractions by chromatography on oligo dT-cellulose as described [80]. To monitor the recovery of RNAs during extraction and fractionation two labelled synthetic oligonucleotides were added, a 50 nt oligonucleotide lacking poly T sequences and a 70 nt long containing a 39T tract at its 3'-terminus.

Supporting Information

Figure S1 Accumulation of viral proteins during influenza virus infection of SFPQ/PSF-silenced cells. Cultures of human A549 cells were transfected with SFPQ/PSF-specific

(S1) or control siRNAs (siCTRL) as described under Materials and Methods and then infected with influenza virus at a moi of 3 pfu/cell. At the times after infection indicated, total cell extracts were prepared and used for Western-blot with the antibodies indicated to the right.

(TIF)

Figure S2 Dependence of SFPQ/PSF for the *in vitro* polyadenylation of transcripts. Recombinant RNPs were generated in control-silenced (C) or SFPQ/PSF-silenced (S2) HEK293T cells and *in vitro* transcription was performed as indicated in the legend to Figures 11 and 12. The transcripts were separated into poly A⁺ (blue) and poly A⁻ (yellow) fractions, using a non-polyadenylated oligonucleotide (50 nt) and a polyadenylated oligonucleotide (70 nt) as recovery probes, and the fractionated transcripts were analysed by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gels. (A) Representative results of two independent experiments. The positions of a 248 nt marker identical to the clone 23 genome, as well as the recovery probes are indicated to the left. (B) Quantification of the proportion of the poly A⁺ and poly A⁻ transcripts after normalisation for recovery. The data represent averages and ranges of two experiments. (C) The silencing of SFPQ was controlled by Western-blot, using actin as loading control. The proper reconstitution of recombinant RNPs was ascertained by Western-blot with antibodies specific for PA and NP. (TIF)

References

- Palese P, Shaw M (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 1647–1689.
- Coloma R, Valpuesta JM, Arranz R, Carrascosa JL, Ortín J, et al. (2009) The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. PLoS Pathog 5: e1000491.
- Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, et al. (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. J Virol 74: 156–163.
- Elton D, Digard P, Tilley L, Ortín J (2005) Structure and function of the influenza virus RNP. In: Kawaoka Y, ed. Current Topics in Influenza Virology. Norfolk: Horizon Scientific Press. pp 1–92.
- Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. Curr Top Microbiol Immunol 283: 121–143.
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortín J (2011) The influenza virus RNA synthesis machine: Advances in its structure and function. RNA Biology 8: 1–9.
- Biswas SK, Nayak DP (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. J Virol 68: 1819–1826.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1990) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J 8: 3867–3874.
- Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, et al. (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. Nature 458: 914–918.
- Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, et al. (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. Nat Struct Mol Biol 15: 500–506.
- Ulmanen I, Broni BA, Krug RM (1981) The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 7355–7359.
- Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, et al. (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. Nature 458: 909–913.
- Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, et al. (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 308–313.
- Resa-Infante P, Recuero-Checa MA, Zamarreño N, Llorca O, Ortín J (2010) Structural and functional characterisation of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex. J Virol 84: 10477–10487.
- Torreira E, Schoehn G, Fernandez Y, Jorba N, Ruigrok RW, et al. (2007) Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. Nucleic Acids Res 35: 3774–3783.
- Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E, et al. (2003) Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. J Biol Chem 278: 20381–20388.
- Fodor E, Crow M, Mingay LJ, Deng T, Sharps J, et al. (2002) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. J Virol 76: 8989–9001.
- Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. J Virol 76: 5098–5108.
- Perales B, Ortín J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. J Virol 71: 1381–1385.
- Detjen BM, St Angelo C, Katze MG, Krug RM (1987) The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. J Virol 61: 16–22.
- Huet S, Avilov S, Ferbitz L, Daigle N, Cusack S, et al. (2009) Nuclear import and assembly of the influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy. J Virol 84: 1254–1264.
- Jorba N, Area E, Ortín J (2008) Oligomerization of the influenza virus polymerase complex *in vivo*. J Gen Virol 89: 520–524.
- Engelhardt OG, Smith M, Fodor E (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. J Virol 79: 5812–5818.
- Gabriel G, Herwig A, Klenk HD (2008) Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin alpha1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. PLoS Pathog 4: e11.
- Honda A (2008) Role of host protein Ebp1 in influenza virus growth: intracellular localization of Ebp1 in virus-infected and uninfected cells. J Biotechnol 133: 208–212.
- Honda A, Okamoto T, Ishihama A (2007) Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. Genes Cells 12: 133–142.
- Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortín J, Nieto A (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. J Virol 75: 8597–8604.
- Mayer D, Molawi K, Martínez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, et al. (2007) Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. J Proteome Res 6: 672–682.
- Momose F, Handa H, Nagata K (1996) Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. Biochimie 78: 1103–1108.
- Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, et al. (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. J Biol Chem 277: 45306–45314.
- Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreño N, Fernandez Y, Juarez S, et al. (2008) The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. PLoS One 3: e3904.

Table S1 Oligonucleotides used as probes for detection of viral RNAs. The Table shows the sequences of the oligonucleotides used as probes for hybridisation to vRNAs, mRNAs and cRNAs, corresponding to the M, NP and NS segments as indicated. The length of the probes and the concentration of formamide used during the hybridisation reactions are also indicated. Likewise, the sequences used for amplification of NS1 mRNA (NS1 intron), NS2 mRNA (NS2 border) and total NS mRNAs (Total NS) are indicated, as well as the corresponding Taqman probes. (PDF)

Acknowledgments

We thank Puri Fortes, Adolfo García-Sastre, Jose Antonio Melero, Ariel Rodríguez and Juan Carlos de la Torre for providing biological reagents. We thank Puri Fortes for advice with the titration of Adenovirus and Alfredo Castelló for advice with siRNA silencing. The technical assistance of Silvia Gutierrez-Erlandsson, Yolanda Fernández, Noelia Zamarreño and Marcela Benavides is gratefully acknowledged.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SL-B NJ MP-C JO. Performed the experiments: SL-B NJ. Analyzed the data: SL-B NJ JO. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP-C. Wrote the paper: SL-B NJ JO.

32. Shimizu K, Handa H, Nakada S, Nagata K (1994) Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res* 22: 5047–5053.
33. Kawaguchi A, Nagata K (2007) De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J* 26: 4566–4575.
34. Jorba N, Juarez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamarreno N, et al. (2008) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8: 2077–2088.
35. Li G, Zhang J, Tong X, Liu W, Ye X (2011) Heat shock protein 70 inhibits the activity of influenza A virus ribonucleoprotein and blocks the replication of virus in vitro and in vivo. *PLoS One* 6: e16546.
36. Kawaguchi A, Momose F, Nagata K (2011) Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol* 85: 6197–6204.
37. Shav-Tal Y, Zipori D (2002) PSF and p54(nrb)/NonO—multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531: 109–114.
38. Patton JG, Porro EB, Galceran J, Tempst P, Nadal-Ginard B (1993) Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 7: 393–406.
39. Akhmedov AT, Lopez BS (2000) Human 100-kDa homologous DNA-pairing protein is the splicing factor PSF and promotes DNA strand invasion. *Nucleic Acids Res* 28: 3022–3030.
40. Bladen CL, Udayakumar D, Takeda Y, Dynan WS (2005) Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor. *J Biol Chem* 280: 5205–5210.
41. Morozumi Y, Takizawa Y, Takaku M, Kurumizaka H (2009) Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities. *Nucleic Acids Res* 37: 4296–4307.
42. Straub T, Grue P, Uhse A, Lisby M, Knudsen BR, et al. (1998) The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction. *J Biol Chem* 273: 26261–26264.
43. Straub T, Knudsen BR, Boege F (2000) PSF/p54(nrb) stimulates “jumping” of DNA topoisomerase I between separate DNA helices. *Biochemistry* 39: 7552–7558.
44. Peng R, Hawkins I, Link AJ, Patton JG (2006) The splicing factor PSF is part of a large complex that assembles in the absence of pre-mRNA and contains all five snRNPs. *RNA Biol* 3: 69–76.
45. Peng R, Dye BT, Perez I, Barnard DC, Thompson AB, et al. (2002) PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *RNA* 8: 1334–1347.
46. Gozani O, Patton JG, Reed R (1994) A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *Embo J* 13: 3356–3367.
47. Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, et al. (2002) Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA* 8: 1102–1111.
48. Dye BT, Patton JG (2001) An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. *Exp Cell Res* 263: 131–144.
49. Melton AA, Jackson J, Wang J, Lynch KW (2007) Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNP L and PSF. *Mol Cell Biol* 27: 6972–6984.
50. Rosonina E, Ip JY, Calarco JA, Bakowski MA, Emili A, et al. (2005) Role for PSF in mediating transcriptional activator-dependent stimulation of pre-mRNA processing in vivo. *Mol Cell Biol* 25: 6734–6746.
51. Marko M, Leichter M, Patrinoiu-Georgoula M, Guialis A (2010) hnRNP M interacts with PSF and p54(nrb) and co-localizes within defined nuclear structures. *Exp Cell Res* 316: 390–400.
52. Zhang Z, Carmichael GG (2001) The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 106: 465–475.
53. Greco-Stewart VS, Thibault CS, Pelchat M (2006) Binding of the polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) to the hepatitis delta virus RNA. *Virology* 356: 35–44.
54. Harris D, Zhang Z, Chaubey B, Pandey VN (2006) Identification of cellular factors associated with the 3′-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* 5: 1006–1018.
55. Zolotukhin AS, Michalowski D, Bear J, Smulevitch SV, Traish AM, et al. (2003) PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol* 23: 6618–6630.
56. Chase G, Deng T, Fodor E, Leung BW, Mayer D, et al. (2008) Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology* 377: 431–439.
57. Falcón AM, Marión RM, Zürcher T, Gómez P, Portela A, et al. (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J Virol* 78: 3880–3888.
58. Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, Skehel JJ (1977) Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 83: 337–355.
59. Hooker L, Sully R, Handa B, Ono N, Koyano H, et al. (2003) Quantitative analysis of influenza virus RNP interaction with RNA cap structures and comparison to human cap binding protein eIF4E. *Biochemistry* 42: 6234–6240.
60. Niedzwiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieszyńska A, et al. (2002) Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5′ cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* 319: 615–635.
61. Worch R, Niedzwiecka A, Stepinski J, Mazza C, Jankowska-Anyszka M, et al. (2005) Specificity of recognition of mRNA 5′ cap by human nuclear cap-binding complex. *RNA* 11: 1355–1363.
62. Li X, Palese P (1994) Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol* 68: 1245–1249.
63. Luo GX, Luytjes W, Enami M, Palese P (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* 65: 2861–2867.
64. Poon LL, Fodor E, Brownlee GG (2000) Polyuridylation mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *J Virol* 74: 418–427.
65. Robertson JS, Schubert M, Lazzarini RA (1981) Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* 38: 157–163.
66. Rajesh C, Baker DK, Pierce AJ, Pittman DL (2010) The splicing-factor related protein SFPQ/PSF interacts with RAD51D and is necessary for homology-directed repair and sister chromatid cohesion. *Nucleic Acids Res* 38.
67. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, et al. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379–387.
68. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, et al. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417–1423.
69. Ortín J, Nájera R, López C, Dávila M, Domingo E (1980) Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* 11: 319–331.
70. Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M (1975) Plaque-assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162: 9–14.
71. Aparicio O, Razquin N, Zaratiegui M, Narvaiza I, Fortes P (2006) Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J Virol* 80: 1376–1384.
72. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, et al. (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* 68: 6900–6909.
73. Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, et al. (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* 37: 305–315.
74. Salvatore M, Basler CF, Parisien JP, Horvath CM, Bourmakina S, et al. (2002) Effects of Influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* 76: 1206–1212.
75. Marión RM, Zürcher T, de la Luna S, Ortín J (1997) Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* 78: 2447–2451.
76. Zürcher T, Marión RM, Ortín J (2000) The protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J Virol* 74: 8781–8784.
77. Jorba N, Coloma R, Ortín J (2009) Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* 5: e1000462.
78. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, et al. (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1373–1376.
79. Valcárcel J, Portela A, Ortín J (1991) Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J Gen Virol* 72: 1301–1308.
80. Perales B, de la Luna S, Palacios I, Ortín J (1996) Mutational analysis identifies functional domains in the Influenza A PB2 polymerase subunit. *J Virol* 70: 1678–1686.

